



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
SEDE IBARRA**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
“ECAA”**

INFORME FINAL DE LA INVESTIGACIÓN

TEMA:

*“BIORREMEDIACIÓN POR MEDIO DE TRATAMIENTO
MICROBIOLÓGICO DE LAS AGUAS RESIDUALES DE LA EMPRESA AIC
PARA LA REDUCCIÓN DE METALES PESADOS Y CIANUROS.”*

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:
INGENIERA EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Línea 2. Ambiente y Biodiversidad

Sublínea: 2.2 Impactos ambientales

AUTORA: JESSICA PAMELA VALENZUELA TORRES

ASESOR: *Ph.D. RUBÉN DEL TORO DENIZ*

Ibarra, Noviembre 2017

Ibarra, 10 de Noviembre de 2017

Ph.D. Rubén del Toro Deniz

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

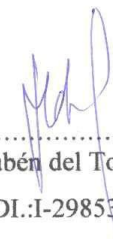
(f)

Ph.D. RUBÉN DEL TORO DENIZ

CDI: I-298533

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):


(f):.....
Ph.D. Rubén del Toro Deniz
CDI.:I-298533


(f):.....
M.Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade
C.C.: 1002658399


(f):.....
Dr. Franklin Javier Miranda Realpe
C.C.:1001581931

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Jessica Pamela Valenzuela Torres, declaro conocer y aceptar la disposición del Art.66 del Instructivo de Trabajo de Grado de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI), que en su parte pertinente manifiesta textualmente: “Forman parte del patrimonio de la universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través o con el apoyo financiero, académico o institucional de la universidad”

Ibarra, 10 de noviembre del 2017

f).....


C.C.:100354385-5

AUTORÍA

Yo, Jessica Pamela Valenzuela Torres, portador de la cédula de ciudadanía N° 100354385-5, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y que se ha respetado las diferentes fuentes de información realizando las citas correspondientes.



FIRMA

Jessica Pamela Valenzuela Torres

c.c.: 100354385-5

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo: Jessica Pamela Valenzuela Torres, con CC: 1003543855, autor del trabajo de grado titulado: "Biorremediación Por Medio De Tratamiento Microbiológico De Las Aguas Residuales De La Empresa AIC Para La Reducción De Metales Pesados Y Cianuros", Previó a la obtención del título profesional de Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA).

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 10 de Noviembre del 2017

(f.).....

Jessica Pamela Valenzuela Torres

C.C.: 100354385-5

DEDICATORIA

Este proyecto de investigación previo a la obtención de mi título se lo quiero dedicar con gran humildad y afecto a Dios y a mi madre quienes supieron guiar mis pasos y convertirme en una persona íntegra con valores y principios, capaz de tomar decisiones propias y de atenerse a las consecuencias que estas contraen.

Pamela Valenzuela Torres

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es el resultado de la dedicación y esfuerzo de todos los que de una manera u otra supieron apoyarme.

Un agradecimiento infinito a mi familia, en especial a quienes durante toda esta etapa y a lo largo de toda mi vida me han apoyado, motivado, a los que creyeron en todo momento y no dudaron de mis habilidades.

Me faltan las palabras para expresar mi más sincero agradecimiento a mi madre Rocío Torres, por darme la vida, guiar mis pasos, por inculcar principios y valores que me han convertido en la mujer de hoy, mil gracias por estar conmigo a pesar de las adversidades y no desfallecer.

Un agradecimiento especial a mi Abuelita Eloisa Flores y a mis tíos Milton y Martha Torres quienes a través de sus sabios consejos y de su ejemplo me han enseñado a no rendirme ante nada y perseverar hasta alcanzar mis metas.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y sabiduría, un eterno agradecimiento a mi querida universidad la cual abre sus puertas a jóvenes como nosotros, preparándonos para un futuro competitivo y formándonos como personas de bien.

Así mismo un agradecimiento a mi gran amigo Líder Armijos y al Ing. Marco Estrella que sin su apoyo continuo nada de esto hubiese sido posible, muchas gracias por haberme abierto las puertas de la empresa “AIC” quien con su ayuda desinteresada, nos brindó información relevante que dio paso para la culminación de esta investigación.

Por último, agradezco a mis amigos y futuros colegas que más que amigos a lo largo de estos cinco años se convirtieron en parte de mi familia, a ellos quiero decirles que sin su apoyo y colaboración la universidad no hubiese sido lo mismo.

RESUMEN

Para el Ecuador el oro se ha convertido en el cuarto producto en importancia en las exportaciones ecuatorianas no petroleras. (Banco Central del Ecuador, 2016). Para la extracción de oro, la principal técnica manejada es la lixiviación con cianuro debido a su forma eficiente, barata y simple. Los residuos de cianuro y sus derivados con varios metales pesados representan un riesgo enorme para los ecosistemas y la salud pública. (Cornejo La Torre, 2016). Esta investigación tuvo como objetivo, caracterizar el agua residual de la Empresa AIC mediante análisis Físico químico completo de laboratorio, determinando la calidad de la misma, las muestras de agua fueron tomadas directamente en la piscina 10C lugar que almacena actualmente las descargas de la empresa AIC, y enviadas al laboratorio acreditado por el SAE, GRUENTEC CIA Ltda., además se aisló las cepas bacterianas activas con respecto a los contaminantes para emplearlas en los tres diferentes procesos de biorremediación tomados en cuenta para esta investigación. Se aplicó las cepas bacterianas en un ensayo a escala de laboratorio en las instalaciones de la PUCE-SI, y se identificó si el tratamiento para la remediación de aguas industriales, fue efectivo.

Los resultados demostraron que existe una reducción significativa en los niveles de Cianuro y Mercurio, con un porcentaje de reducción para el Cianuro de 90,75 % y para el Mercurio de 82%.

Palabras Claves: Minería, Cianuro, Metales pesados, Biorremediación.

ABSTRACT

For Ecuador gold it becomes in the fourth product in importance in Ecuadorian exportations not petroleum (Banco Central del Ecuador, 2016). For gold extraction, the main technique set, is the leaching with cyanide waste and its derivatives with different heavy metals, represent a huge risk for ecosystems and public health. (Cornejo La Torre, 2016). This research has as goals, shows that the waste water of AIC enterprise through a full chemical physical analysis of laboratory, it determines its quality. The water shown were taken straight in the pool 10C, place that storage actually the discharges of AIC enterprise and sent to approved laboratory by SAE, GRUENTEC Cia Ltda. besides it kept away the active bacteria respect to the contaminants to be used in three different processes of bioremediation been taken for this research. The bacteria were applied in training in a laboratory scale in the PUCESI shops that was identified if the treatment for industrial water remediation, it was effective.

The results, is shown, that exists a significant reduction in the levels of cyanide and mercury, with a percentage of reduction for cyanide 90, 75% and for mercury 82%.

Key words: Mining, Cyanide, Heavy Metals, Bioremediation

INDICE

PORTADA:	i
CERTIFICACIÒN	ii
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	ii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INDICE	xi
INDICE DE TABLAS	xiv
INDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE ANEXOS	xv
INTRODUCCIÓN	xvi
CAPITULO I	17
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
1.2. JUSTIFICACIÓN	18
1.3. OBJETIVOS	20
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	20
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
1.4. HIPOTESIS	20
CAPITULO II	21
2. ESTADO DEL ARTE	21
2.2. La minería artesanal	21
2.3. El Cianuro y los Metales Pesados	21
2.3.1. Mecanismos y niveles de toxicidad del Cianuro	22
2.3.2. Factores que afectan la toxicidad del Cianuro	23
2.4. Toxicidad de Metales Pesados en la minería	23
2.5. Cromo (Cr)	24

2.6. Mercurio (Hg).....	24
2.7. Plomo (Pb).....	25
2.8. Biodisponibilidad.....	26
2.9. Transformaciones mediadas por microorganismos.....	26
2.10. Mecanismos moleculares de resistencia a Metales Pesados en las bacterias.....	27
2.10.1. Movilización Del Metal O Biolixiviación	28
2.10.2. Inmovilización De Metales Pesados.....	28
2.10.2.1. Biosorción.....	29
2.10.2.2. Bioacumulación	30
2.10.2.3. Biotransformación.....	30
2.10.2.4. Quimisorción mediada por microorganismos	30
2.11. Enfoques de la biorremediación	31
CAPITULO III.....	32
3.1. Ubicación Del Proyecto	32
3.2. Materiales y Metodología De La Investigación.....	33
3.2.1. Diseño Experimental.....	33
3.2.2. Toma de Muestras.....	33
3.2.3. Determinación de Cianuro Total por Análisis de flujo segmentado, Método SM 4500 CN.....	35
3.2.4. Análisis de metales pesados, Método de metales por ICP-MS (plasma inductivo acoplado y espectrometría de masas).....	35
3.3. Determinación de las técnicas	36
3.4. Análisis Físico Químicos	38
3.5. Aislamiento de microorganismos.....	41
3.6. Caracterización Molecular	42
3.7. Extracción de ADN	43
3.8. Amplificación del gen ADNr 16s.....	44

CAPITULO IV	48
4. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1. Resultados obtenidos de los análisis de Cianuro (CN⁻).....	48
4.1.1. Análisis estadístico de reducción de Cianuro (CN⁻)	49
4.2. Resultados obtenidos de los análisis de Metales pesados.....	51
4.2.1. Resultados obtenidos de los análisis de Mercurio.....	53
4.3. Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales	55
• Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales	
primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo	56
• Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales	
segundo tratamiento: Bioaumentación	59
• Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales	
tercer tratamiento: Estimulación	62
4.4. Caracterización molecular	64
4.5. Socialización de la investigación.....	67
CAPITULO V	71
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
5.1. Conclusiones	71
5.2. Recomendaciones	72
Bibliografía.....	73
ANEXOS.....	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación de los compuestos de Cianuro en la extracción de oro.</i>	22
Tabla 2. <i>Tratamientos aplicados y el total de unidades experimentales.</i>	33
Tabla 3 <i>Reactivos utilizados para la PCR.</i>	44
Tabla 4. <i>Preparación de las soluciones stock de DGGE.</i>	46
Tabla 5. <i>ANOVA de la concentración final de Cianuro durante el ensayo</i>	50
Tabla 6. <i>ANOVA de la concentración final de Mercurio durante el ensayo</i>	54
Tabla 7. <i>Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas del primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo</i>	56
Tabla 8. <i>Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas segundo tratamiento: Bioaumentación</i>	59
Tabla 9. <i>Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas tercer tratamiento. Estimulación</i>	62
Tabla 10. <i>Secuencias relativas más aproximadas resultado del análisis DGGE</i>	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mapa de Ubicación del Proyecto</i>	32
Figura 2. <i>Envases entregados por el laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.</i>	35
Figura 3. <i>Método de siembra de agotamiento por estrías.</i>	42
Figura 4: <i>Visualización de las bandas en el transiluminador UV LabNet™ Inc. Y separación de las OTU's más representativas</i>	47
Figura 5. <i>Gráfica de la concentración de Cianuro (CN⁻) en los diferentes tratamientos de remediación aplicados a la investigación.</i>	49
Figura 6. <i>Concentración (mg/l) final de Cianuro al inicio y después de la aplicación de los diferentes tratamientos de remediación, durante el ensayo.</i>	50
Figura 7. <i>Gráfica del porcentaje de reducción de Mercurio en los diferentes tratamientos aplicados durante la investigación</i>	53
Figura 8. <i>Concentración (mg/l) final de Mercurio al inicio y después de la aplicación de los diferentes tratamientos, durante el ensayo.</i>	54
Figura 9. <i>Gráfica de los Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas del primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo</i>	57
Figura 10. <i>Grafica de los Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas segundo tratamiento: Bioaumentación</i>	60

Figura 11. <i>Gráfica de los Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas tercer tratamiento. Estimulación.....</i>	63
Figura 12. <i>Análisis de similitud (Bray-Curtis) del patrón de bandas obtenidas mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE.....</i>	66
Figura 13. <i>Escalamiento multidimensional del patrón de bandas obtenidas mediante DGGE.....</i>	66
Figura 14. <i>Gráfica de la Tabulación del aspecto organizacional del evento de socialización.....</i>	68
Figura 15. <i>Gráfica de la tabulación del aspecto ejecución del evento por parte del expositor.....</i>	69
Figura 16. <i>Gráfica de la tabulación del aspecto medición de impacto de la investigación.....</i>	70
INDICE DE ANEXOS	
Anexo 1. <i>Toma de muestras para la obtención de cepas bacterianas.....</i>	78
Anexo 2. <i>Aislamiento de Cepas Bacterianas.....</i>	78
Anexo 3. <i>Área de ubicación del ensayo.....</i>	79
Anexo 4. <i>Amplificación de ADN.....</i>	79
Anexo 5. <i>Técnica de DGGE.....</i>	80
Anexo 6. <i>Frascos utilizados para el envío de muestras al laboratorio GRUENTEC Cia Ltda.....</i>	80
Anexo 7. <i>Resultado de análisis muestra inicial (Inicio).....</i>	81
Anexo 8. <i>Resultado del primer envío de 9 muestras enviadas al Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.....</i>	83
Anexo 9. <i>Resultado del segundo envío de 9 muestras enviadas al Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.....</i>	85
Anexo 10. <i>Resultado del segundo envío de 9 muestras enviadas al Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.....</i>	87
Anexo 11. <i>Encuesta del proceso de socialización de investigación.....</i>	89
Anexo 12. <i>Socialización de la investigación a integrantes de AIC.....</i>	90
Anexo 13. <i>Exposición de los resultados a los participantes de la empresa AIC.....</i>	90
Anexo 14. <i>Lista de asistencia a socialización de investigación.....</i>	91

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación denominado “Biorremediación por medio de tratamiento microbiológico de las aguas residuales de la empresa AIC para la reducción de metales pesados y cianuros.” en la provincia de Imbabura, parroquia García Moreno, en el cantón Cotacachi, En la Comunidad el Corazón tiene como fin, caracterizar la calidad de agua producto de extracción de oro por la Empresa Agroindustrial el Corazón y plantear una alternativa viable para la biorremediación de la misma.

La investigación consta de cinco capítulos: El Primer Capítulo se basa en las generalidades del proyecto, es decir la introducción, planteamiento del problema, justificación y los objetivos que hacen que el proyecto pueda ser efectuado de la mejor manera, el segundo capítulo nos habla sobre el componente del marco teórico conteniendo la información bibliográfica necesaria para relacionar el tema de investigación con los tratamientos de biorremediación y toda la información referente a metales pesados y cianuro, además se presenta información sobre la afectación de la minería tanto como para las plantas y animales como para los seres humanos. El Tercer Capítulo trata de la metodología, ubicación y materiales necesarios utilizados para el desarrollo del proyecto, en cuanto a la metodología aquí específicamente se dedica a explicar cómo se realizó la investigación. El Cuarto Capítulo presenta los resultados obtenidos durante la fase práctica que se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y también los resultados de los análisis realizados por el laboratorio acreditado GRUENTEC Cía. Ltda. de la ciudad de Quito. Y por último el Capítulo Cinco que es donde se explican las conclusiones de toda la investigación y las recomendaciones pertinentes.

CAPITULO I

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Ecuador la industria minera ha contaminado grandes cantidades del recurso hídrico debido a que el país no posee una gestión integral adecuada para este recurso.

La Empresa minera “Agroindustrial El Corazón” para sus procesos de extracción utiliza el método de lixiviación con cianuro. Estos residuos de cianuro y sus derivados con diferentes metales pesados son un riesgo enorme para varios tipos de ecosistemas y también para la salud pública. La extracción de minerales la realizan a través de labores mineras subterráneas y posteriormente a partir del material arrancado se obtiene el oro y plata. (Falconi, F. 2012).

AIC, capta el agua para todos sus procesos de la Vertiente Manduriacu aledaña al proyecto. Durante el proceso para obtener los metales utilizan varios productos químicos como: Bórax, Nitrato de Potasio, Cianuro y Cal en la molienda, Ácido Nítrico, Carbonato de Sodio (Falconi, F. 2012), después de la obtención de los metales, la empresa genera desechos líquidos, “AIC” cuenta con un sistema de recirculación de agua, que aprovecha al máximo los químicos utilizados en los diferentes procesos que realiza la planta de beneficio, (EMPRESA AGROINDUSTRIAL EL CORAZÓN, 2011). Pero a pesar de los sistemas que se utilizan el producto final sigue estando contaminado.

Al finalizar con el proceso de extracción y después de pasar el agua por el sistema de recirculación esta es vertida a un serpentín el cual en su recorrido agrega oxígeno u aire a el agua y llega a la Vertiente Verde Chico, el problema que se presenta en la zona, involucra a las descargas de agua residual de la Empresa, esto es debido a los diferentes procesos que tienen lugar en la extracción de minerales los que pueden alterar la calidad de la Vertiente Verde Chico, que es utilizada por las personas aledañas al proyecto como medio de riego para los cultivos y recreación, si no se realiza un tratamiento alternativo previo a la descarga los niveles de contaminación pueden ser devastadores debido a su

composición química. (Quintana, 2002) siendo capaces de alterar los diferentes ecosistemas presentes en la zona y alrededores al proyecto.

1.2. JUSTIFICACIÓN

La actividad minera como la mayor parte de las actividades que realiza el hombre para poder desarrollarse, crea cierto grado de alteraciones en el ambiente.

La Empresa minera “Agroindustrial El Corazón” viene desarrollando actividades de explotación de minerales polimetálicos desde hace 16 años aproximadamente; a este proyecto se lo califico como Minería Comunitaria a pequeña escala. AIC es una empresa privada, localizada en la Cordillera Occidental a unos 60km al Noroeste de Quito, se sitúa a una cota de 800msnm, en un área de espesa cobertura arbórea y niveles de meteorización profundos. (Falconi, F. 2012)

Las primeras actividades de exploración fueron realizadas por diferentes empresas que antecieron a la actual. Los inicios de “AIC” fueron dados por la compañía canadiense, Balaclava Mines Inc. que operó el área desde 1997 hasta 1999 para investigar el potencial de explotación para minería en volumen de bajo costo, después estas actividades fueron retomadas por la Empresa Bonanza y Verde Chico. (Falconi, F. 2012). Dejando así el camino abierto para “AIC”.

Según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente ((PNUMA), la industria minera genera contaminación en acuíferos y aguas superficiales, esto debido a la concentración elevada de metales pesados que esta industria produce. Con el tiempo se puede comprometer seriamente el uso de agua para el consumo humano. (PNUMA, 2012),

Actualmente el uso de tecnologías más avanzadas en la minería como cianuración, flotación, electrolisis está llevando a la mejora de los procesos de extracción de oro y a la preocupación de todos los involucrados en la preservación y mejora del medio, pero incluyendo incluso personal calificado para este fin entre los trabajadores de la empresa.

(Pesántez Vallejo, J. P. 2014). También tenemos elementos relacionados específicamente con la extracción del oro como son: Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Arsénico (As), Cobre (Cu), Zinc (Zn), (Appleton, Williams, Orbea, & Carrasco, 2001). Que contaminan en un grado considerable y pueden llegar a dañar de forma irreversible tanto el suelo como el recurso agua.

Es por eso que se plantea esta investigación, que tiene como finalidad, evaluar el contenido de Metales pesados (Mercurio, Cromo, Plomo) y Cianuro presentes durante el proceso de extracción del metal y en un ensayo a nivel laboratorio por medio de un tratamiento microbiológico mejorar la calidad del agua, intentando prevenir la contaminación de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos que se encuentran en la zona de influencia, ayudando a preservar la fauna y flora características del bosque Húmedo Tropical de la zona, garantizar el aprovechamiento del recurso agua de manera general tanto por parte de la comunidad como del proyecto y asegurar la responsabilidad social que tiene la empresa con la comunidad El Corazón.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Biorremediar por medio de tratamiento Microbiológico las aguas residuales de la Empresa AIC para la reducción de metales pesados y cianuros.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.3.2.1. Caracterizar el agua residual de la Empresa AIC mediante análisis Físico químico completo de laboratorio, determinando la calidad de la misma.
- 1.3.2.2. Aislar las cepas bacterianas activas con respecto a los contaminantes para emplearlas en el proceso de biorremediación
- 1.3.2.3. Aplicar las cepas bacterianas en un ensayo a escala de laboratorio, identificando si el tratamiento para la remediación de aguas industriales es efectivo.
- 1.3.2.4. Socializar el proyecto de investigación a los miembros de la empresa y representantes de las comunidades aledañas, mediante un día de campo en la casa comunal del Corazón, mostrando los resultados obtenidos y los efectos de la toxicidad más sus posibles soluciones en el proceso de tratamiento de agua.

1.4. HIPOTESIS

¿El proceso de Biorremediación por medio de un tratamiento microbiológico mejorará la calidad de agua del efluente Verde Chico, en la comunidad El Corazón, parroquia García Moreno, provincia de Imbabura?

CAPITULO II

2. ESTADO DEL ARTE

2.2. La minería artesanal

La minería a pequeña escala o más conocida como artesanal en el Ecuador es un problema que viene afectando al medio desde inicios de los años ochenta, con diferentes elementos químicos como son: Mercurio (Hg), Arsénico (As), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Cromo (Cr), Plomo (Pb); elementos que específicamente están relacionados con la extracción de oro. La principal forma de dispersión de los desechos de la minería es por el medio fluvial el cual puede llegar a contaminar mucha área: bosques, cultivos y ríos (Appleton, Williams, Orbea, & Carrasco, 2001).

Toda minería que en sus operaciones utilice cianuro puede tener dos tipos de impactos, esto según su cuidado, el primero es un impacto local y de corto plazo, pero el segundo y más preocupante es, el de mediano y largo plazo ya que en estos casos los residuos de la mina actúan como "bombas químicas demoradas". Este compuesto es muy resistente, e incluso después de muchos años cerrados la mina puede provocar verdaderas catástrofes. (Montenegro, R. 2003).

2.3. El Cianuro y los Metales Pesados

El cianuro es uno de los únicos agentes químicos que pueden disolver al oro una de las razones que hace a este metal tan caro, también es un compuesto considerado altamente peligroso que ha sido utilizado industrialmente desde hace mucho tiempo atrás principalmente en la fabricación de plásticos y sus derivados y otro pequeño pero significativo porcentaje en la industria minera.

El cianuro impacta la biota y a los seres humanos a altas, medias y bajas dosis, es fitotóxico es decir que interfiere en la fotosíntesis de las plantas verdes. En organismos animales el cianuro puede ser absorbido por la piel, ingerido e ingresar al aparato digestivo, o inhalado. Concentraciones de cianuro de hidrógeno de 200 ppm son letales

para muchos animales. En ambiente acuático concentraciones como $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ afectan la biota más sensible. En 1980 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, EPA, estableció un valor máximo permisible de cianuro libre, para la protección de la vida acuática, de $3,5 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ para un promedio de 24 horas, y un límite máximo, en todo momento, de $52 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$. (Montenegro, R. 2003).

Los compuestos de cianuro presentes en la minería del oro, en las soluciones y efluentes de cianuración son: el cianuro libre, sales de cianuro de metales alcalinos y alcalino térreos y complejos de cianuros metálicos formados con oro (Au), mercurio (Hg), cadmio (Cd), zinc (Zn), plata (Ag), cobre (Cu), níquel (Ni), hierro (Fe) y cobalto (Co). Estos compuestos se pueden clasificar en cinco categorías generales, como se muestra en la tabla 1, (Cáceres, 2001).

Tabla 1. Clasificación de los compuestos de Cianuro en la extracción de oro.

Clasificación	Compuesto
1. Cianuro libre	CN^- , HCN
2. Compuestos simples	
a) Fácilmente solubles	NaCN, KCN, $\text{Ca}(\text{CN})_2$, $\text{Hg}(\text{CN})_2$
b) Sales neutras insolubles	$\text{Zn}(\text{CN})_2$, $\text{Cd}(\text{CN})_2$, CuCN, $\text{Ni}(\text{CN})_2$, AgCN
3. Complejos débiles	$\text{Zn}(\text{CN})_4^{-2}$, $\text{Cd}(\text{CN})_3^-$, $\text{Cd}(\text{CN})_4^{-3}$
4. Complejos moderadamente fuertes	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$, $\text{Co}(\text{CN})_6^{-4}$, $\text{Au}(\text{CN})_2^-$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$

Fuente: (Cáceres Arenas, G. 2001). Impacto Ambiental de la minería del Oro. *Revista Metalúrgica UTO*, 19.

Elaborado por: Pamela Valenzuela, *Clasificación de los compuestos de cianuro en la extracción de oro.*

2.3.1. Mecanismos y niveles de toxicidad del Cianuro

El cianuro libre se incorpora en un organismo vivo por ingestión, inhalación o absorción a través de la piel. Su toxicidad puede ser aguda o crónica. La toxicidad aguda está relacionada con los efectos letales inmediatos observados en organismos expuestos a concentraciones elevadas de un compuesto particular, este periodo puede durar unos pocos minutos o varios días, se mide por el LC_{50} (lethal concentration), que corresponde a la concentración letal de un tóxico que causa la muerte del 50% de la población de

organismos durante un lapsus de tiempo determinado. El periodo de tiempo usual es de 96 horas a cuatro días. Las exposiciones prolongadas a concentraciones subletales conducen a la toxicidad crónica, que se muestra por la incapacidad motriz y anormalidades fisiológicas permanentes.

El cianuro no es un tóxico que se acumule en el organismo, pero los metales ligados al cianuro pueden bioacumularse o bioconcentrarse, provocando un daño fisiológico irreparable o a su vez haciendo que un organismo sea no apto para el consumo de los seres vivos. (Cáceres, 2001).

2.3.2. Factores que afectan la toxicidad del Cianuro

Existen diferentes factores capaces de afectar la toxicidad del cianuro entre estos tenemos a la Concentración total de cianuro, la falta de oxígeno, aumento de temperatura, pH, Tipo de metal que forma el complejo, Presencia de tiocianato, cianato o amoníaco y Sólidos en suspensión.

2.4. Toxicidad de Metales Pesados en la minería

Los metales pesados son elementos químicos metálico que tienen una relativa alta densidad y a demás son dañinos o venenosos en concentraciones incluso muy bajas.

Algunos ejemplos de metales pesados producto de la minería, incluyen al talio (Tl), el mercurio (Hg), arsénico (As), cromo (Cr) y plomo (Pb), cadmio (Cd), entre otros (Lucho *et al.*, 2005; Méndez, J. P., *et al.*, 2009).

Los metales pesados generalmente se encuentran como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No se pueden degradar ni tampoco pueden ser destruidos fácilmente de forma biológica o natural ya que no poseen funciones metabólicas específicas para los organismos vivos, estos elementos son peligrosos porque tienden a bioacumularse lo que significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente. (Méndez *et al.*, 2009).

Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran:

- a) Desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales.
- b) Modificación de la conformación de enzimas y polinucleótidos.
- c) Ruptura e inhibición de biomoléculas.
- d) Modificación de otros agentes biológicamente activos.

La intoxicación producto de metales pesados dependerá no solamente de su concentración sino también del tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente. (Nava., Elorza, Pérez, Uribe, 2007).

2.5. Cromo (Cr)

Las principales fuentes antropogénicas de contaminación del cromo son las actividades mineras e industriales, este elemento es un metal reductor activo y en el medio ambiente se encuentra principalmente en las formas trivalente, Cr (III) y hexavalente, Cr (VI). La toxicidad y movilidad depende de su estado de oxidación. El Cr (VI) es muy tóxico y tiene una gran movilidad mientras que el Cr (III) no es tóxico a bajas concentraciones y su movilidad es baja ya que el $\text{Cr}(\text{OH})_3$ es poco soluble. (Leyva, R., Flores, J. V., Díaz, P. E., & Berber, M. S. 2008).

El cromo (III) es un oligoelemento, indispensable para procesos bioquímicos y fisiológicos necesarios para la vida, específicamente tiene acciones en el metabolismo de la glucosa, el colesterol y los ácidos grasos, además de desempeñar un papel muy importante en diferentes reacciones enzimáticas. El cromo (VI) es un elemento altamente tóxico para el ser humano y está clasificado por la IARC (International Agency for Research on Cancer) en el grupo I (cancerígeno comprobado en humanos) ya que en exposición ocupacional produce cáncer en el sistema respiratorio. (Téllez, J., Roxs, M. C., & Gaitán, A. M. (2004).

2.6. Mercurio (Hg)

Este es un elemento natural de la tierra, está presente en la corteza terrestre en un promedio de $0,05 \text{ mg/kg} \cdot 1^{-1}$, con significativas variaciones locales. Los niveles de mercurio en el

ambiente han aumentado desde el inicio de la era industrial. Este se encuentra actualmente en diversos medios y alimentos (especialmente el pescado) en todas partes del mundo a niveles que afectan adversamente a los seres vivos. (PNUMA. 2012).

En su forma pura, se lo conoce como mercurio “elemental” o “metálico”. Rara vez se le encuentra en su forma pura es decir como un metal líquido; es más común encontrarlo en compuestos y sales inorgánicas, puede enlazarse con otros compuestos como el mercurio monovalente o divalente (representado como Hg (I) y Hg (II). A partir del mercurio divalente Hg (II) se pueden formar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos, como el metilmercurio, este tiene efectos adversos para los seres vivos, ya que llega a través rápidamente la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica, y es un neurotóxico que puede afectar muy negativamente el desarrollo del cerebro. (PNUMA. 2012).

Hay estudios en los que el mercurio ocasiona una reducción de la actividad microbiológica vital en la cadena alimentaria terrestre en suelos de grandes partes de Europa y posiblemente de muchos otros lugares del mundo con características edafológicas similares. A fin de prevenir los efectos ecológicos del mercurio en suelos orgánicos se han establecido límites críticos preliminares de 0,07-0,3 mg/kg.1⁻¹ de contenido de mercurio total en el suelo (Pirrone, N., *et al.*, 2001).

2.7. Plomo (Pb)

Es un metal tóxico que se encuentra en forma natural, no puede ser degradado o disociado por ser un elemento básico. La producción y uso del plomo en la industria y productos de consumo han expuesto a la población a este metal, Las partículas de plomo pueden ser re suspendidas por el viento y la actividad humana. (Astete, J., *et al.*, 2009).

La intoxicación por plomo ocurre luego de la exposición a este metal. El plomo es absorbido por pulmones y del tracto gastrointestinal, el mecanismo de acción es por unión a los grupos sulfhidrilo y tóxico para las enzimas dependientes de zinc. (Infantas, M. M. V. 2005). Las partículas < 10 µg⁻¹, y especialmente las < 2,5 µg⁻¹, pueden cruzar las defensas del sistema respiratorio y entrar en los pulmones. Los estudios llevados a cabo en las cercanías de fundiciones sugieren que la inhalación directa de plomo presente en el aire es

la principal ruta de absorción en adultos. En los niños la principal ruta de exposición es la ingestión de tierra y polvo contaminado con plomo. (Astete, *et al.*, 2009).

2.8. Biodisponibilidad

La toxicidad de los metales pesados es muy alta para los seres vivos, su acción directa ocurre a través del bloqueo de ciertas actividades biológicas, es decir, primero la inactivación enzimática debido a la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, ocasionando daños irreversibles en los diferentes organismos. (Vullo, 2003).

Para que los metales pesados puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, deben encontrarse disponibles para ser captados por éste, es decir que el metal debe estar biodisponible. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente, que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y lábil. Por esto es esencial determinar el nivel de contaminación por metales pesados de un ambiente, conocer su biodisponibilidad, es decir, la concentración de metal libre y lábil presente en la muestra. (Vullo, 2003).

2.9. Transformaciones mediadas por microorganismos

Los metales se encuentran entre los materiales más conocidos por su utilidad. En el proceso para su aprovechamiento, el ser humano los ha extraído de los depósitos subterráneos, para después de ser fundidos, refinados y convertidos en bienes de consumo ser, utilizados y desechados. A diferencia de los contaminantes de origen orgánico, los metales no pueden ser degradados ni biológicamente ni químicamente; aun cuando los compuestos que contienen metales pueden alterarse, éstos permanecen. No obstante, no todos representan riesgos para el ambiente; algunos no son tóxicos mientras que otros, aun cuando lo sean, son muy escasos o sus compuestos son insolubles. Como resultado, sólo algunos de ellos (Hg, Cd, Pb, Cr, entre otros) se consideran en la actualidad como contaminantes ambientales. (Suárez, P., & Reyes, R. 2002). Otros elementos como el carbono, nitrógeno, azufre y fósforo forman parte de los ciclos biogeoquímicos es decir

que son elementos esenciales para la vida, esto da forma a las interacciones entre los microorganismos y los metales.

La biotecnología ambiental estudia las interacciones entre metal y microbiota, esta rama tiene como objetivo implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos. Además dependiendo del estado de oxidación que presente un metal y la especie que esté conformando, los microorganismos pueden realizar dos transformaciones posibles. Una de movilización del metal, que corresponde al cambio de un estado insoluble inicial (metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos, por ejemplo) correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. Este proceso se conoce con el nombre de lixiviación microbiana. La otra posible transformación corresponde a la inmovilización del metal, es decir el cambio de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. También a su vez existen en la naturaleza diferentes mecanismos por los cuales la inmovilización del metal puede llegar a ocurrir. (Vullo, 2003).

2.10. Mecanismos moleculares de resistencia a Metales Pesados en las bacterias

Las bacterias con el pasar del tiempo y para poder desarrollarse han creado diversos mecanismos de resistencia capaces de tolerar los efectos nocivos que pueden causar los metales tóxicos (Cervantes, C., *et al.*, 2006).

Algunos metales pesados son utilizados como nutrientes traza esenciales para las bacterias, pero en concentraciones micro o milimolares resultan tóxicos, la principal característica que marca la diferencia a estos elementos de los contaminantes orgánicos, es que no son biodegradables por lo que representan una amenaza mayor para todos los organismos. (Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. 2010).

Los plásmidos bacterianos pueden codificar los sistemas de resistencia para los iones metálicos tóxicos. La resistencia a metales funciona dependiendo de la energía del flujo de iones tóxicos. Algunos de los sistemas de eflujo son ATPasas y otros son antiportadores quimiosmóticos catión/protón. La CadA; ATPasa de resistencia de Cadmio de bacterias grampositivas y el CopB; el sistema de eflujo de Cobre de *Enterococcus hirae* son

homólogas a ATPasas de animales y plantas, los determinantes cromosómicos de resistencia a metales tóxicos son conocidos y la distinción entre plásmidos resistentes y genes cromosómicos no es clara ya que, para algunos metales como As, los determinantes de plásmidos y los cromosómicos son básicamente los mismos. (Silver & Phung, 2010)

Los microorganismos pueden realizar dos posibles transformaciones que dependen del estado de oxidación del metal y de la especie que esté conformando. La primera corresponde a la movilización del metal (biolixiviación) y la segunda a la inmovilización de este. Las propiedades de los microorganismos resistentes o tolerantes o ambos pueden ser empleadas en mecanismos de inmovilización de metales pesados que incluyen: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimisorción. (Marrero *et al.*, 2010).

2.10.1. Movilización Del Metal O Biolixiviación

La Biolixiviación se presenta como una alternativa biotecnológica para mejorar la eficiencia del proceso de recuperación de metales y minimizar la contaminación del ambiente. (Agudelo, J. *et al.*, 2016).

Un biolixiviado dentro del concepto de la biorremediación, puede utilizarse dentro de la hidrometalurgia, recuperando metales a partir de materiales sólidos contaminados como cenizas resultantes de quema de desechos, suelos, sedimentos acuáticos, etc. Este proceso se ha aplicado con éxito utilizando bacterias oxidadoras del hierro o sulfuros, como *Thiobacillus ferroxidans* o *Thiobacillus thiooxidans*, respectivamente, en la recuperación de Cu, Ni, Zn y Cd, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, ya que estos microorganismos pueden utilizar el catión Fe^{3+} como último aceptor de electrones en lugar del O_2 . (Vullo, 2003).

2.10.2. Inmovilización De Metales Pesados

La inmovilización de metales pesados es la capacidad que presenta la biomasa microbiana para atrapar metales, uniéndolos a sus componentes estructurales. Esta capacidad depende de las propiedades físicas, químicas y biológicas que presente la biomasa bacteriana. Sin embargo, esto puede mejorar dependiendo de la selección natural, manipulación genética o

manipulación fisicoquímica de las células. Los procesos de inmovilización conocidos son: Bioabsorción y Polímeros Extracelulares. Estos procesos tienen la propiedad de concentrar e inmovilizar metales en soluciones acuosas, haciendo que sus componentes de la superficie celular actúen como bioabsorbentes. Los polímeros estructurales y extracelulares con un alto contenido de grupos funcionales (polianiones), interactúan con los metales atrapándolos dentro de su estructura. (Suárez, P., & Reyes, R. 2002). Los microorganismos utilizados para esta propiedad son aislados a partir de ecosistemas contaminados, estos retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente corto al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. (Vullo, 2003).

Una de las principales ventajas es la minimización en los costos de remediación debido a que no requiere el agregado de nutrientes al sistema, al no requerir un metabolismo microbiano activo. La biomasa es capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de sistemas acuosos, por lo que el proceso de biorremediación es rentable. (Vullo, 2003). También los metales absorbidos se pueden recuperar de forma eficiente (tratamiento ácido) y minimizando los residuos; y finalmente se puede utilizar la biomasa de desecho generada en procesos de fermentación a gran escala. (Suárez, P., & Reyes, R. 2002).

2.10.2.1. Biosorción

Es un término que describe la eliminación de metales pesados por la unión pasiva a biomasa no viva a partir de soluciones acuosas; el mecanismo de remoción no está controlado por el metabolismo (Sala, L. F., *et al.*, 2010), se utiliza para referirse a la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico. (Cañizares-Villanueva, R. O. 2000). El proceso de biosorción es adecuado como técnica de refinamiento en aguas de desecho con metales pesados, en concentraciones en un rango de 1 a 100 ppm. Así, estos niveles se logran disminuir hasta aquellos correspondientes al agua potable, (Sala *et al.*, 2010)

2.10.2.2. Bioacumulación

Es un proceso celular que involucra a un sistema de transporte de membrana la cual internaliza el metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía, este consumo energético se realiza a través de la $H^+ATPasa$; una vez incorporado el metal pesado al citoplasma este es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneinas (MT), fitoquelatinas (FQ) y algunos nuevos péptidos de unión a metales, si se trata de hongos este es compartimentalizado dentro de las vacuolas. (Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. 2016).

2.10.2.3. Biotransformación

Es un proceso que involucra un cambio químico en el metal pesado, como por ejemplo en el estado de metilación u oxidación. La biotransformación de los metales pesados que resultan tóxicos es mediada por enzimas microbianas que puede dar como resultado compuestos volátiles o poco solubles en agua.

Un ejemplo claro en la naturaleza es el ciclo del mercurio (Hg), donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg^{2+} a Hg^0 , y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH_3Hg^+ y $(CH_3)_2Hg$, que son volátiles y mucho más tóxicos que el propio mercurio. (Vullo, 2003).

2.10.2.4. Quimisorción mediada por microorganismos

Es una reacción donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario el cual funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, acelerando y promoviendo así el mecanismo de mineralización.

Un ejemplo es el agregado de Hierro (Fe) en un efluente previó hacer tratado, en presencia de bacterias reductoras del sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de Sulfuro Ferroso (FeS), sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS formado como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe, pueden separarse fácilmente de la fase soluble, decontaminando así el material. (Vullo, 2003).

2.11. Enfoques de la biorremediación

La biorremediación puede llevarse a cabo con dos enfoques principales: La Bioaugmentación, la cual se realiza con la adición externa de microorganismos degradadores o resistentes y la Bioestimulación que se realiza con la adición de nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos y de esta manera aumentar la velocidad de la degradación. Estos enfoques han sido utilizados de una manera exitosa para la recuperación de suelos y agua. (Rodríguez, N. J. P., Carvajal, S., Gallo, A., & Peñuela, G. 2013). Un factor alterno pero muy útil es el bioburbujeo u oxigenación, esto consiste en inyectar aire a presión, este proceso genera principalmente dos efectos: a) el aire inyectado absorbe gran cantidad de los contaminantes presentes en el agua y el suelo; b) el aire eleva los niveles de oxígeno del agua mejorando la biodegradación de los contaminantes. (Alegría Coto, J. R. 2013).

CAPITULO III

3.1.Ubicación Del Proyecto

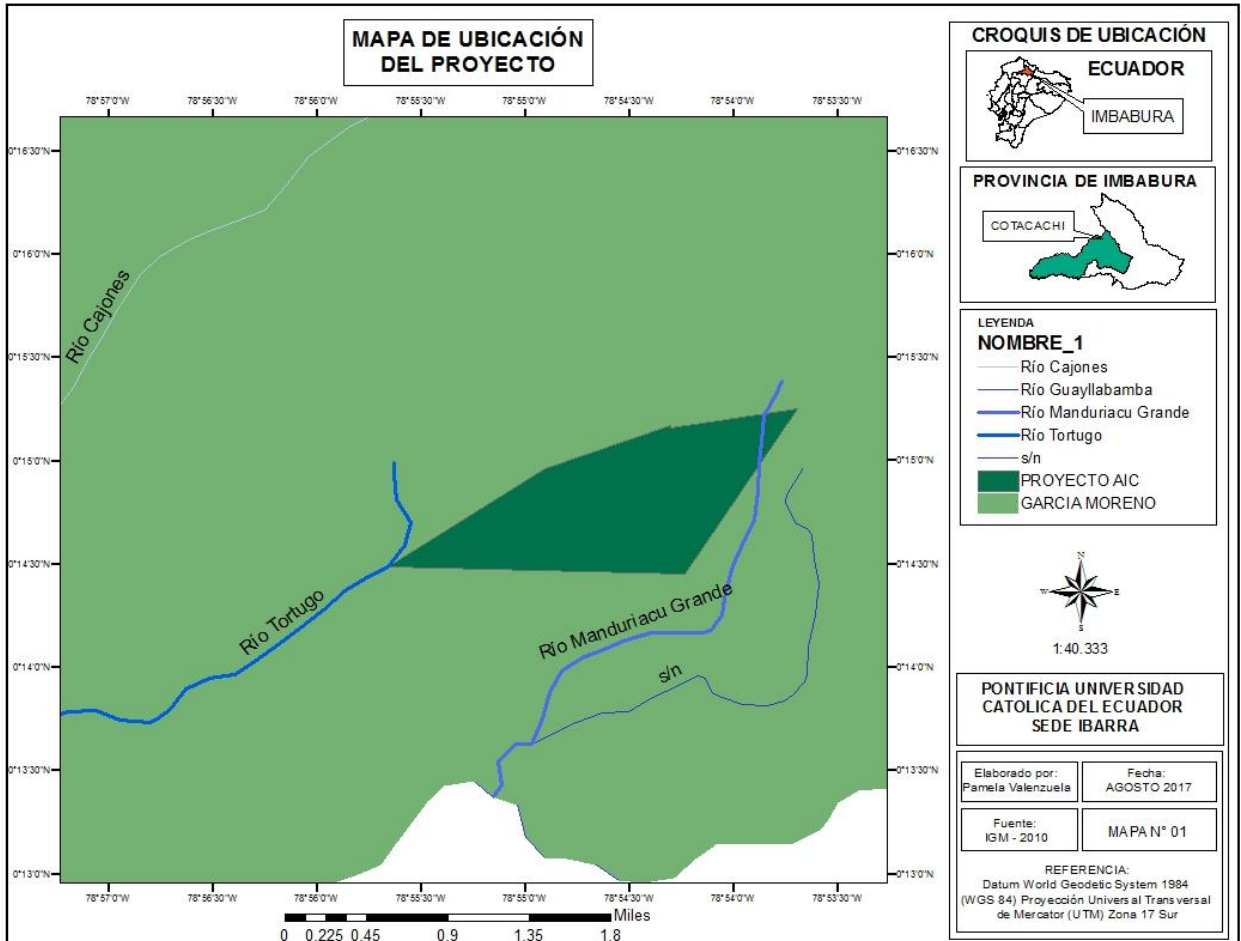


Figura 1. Mapa de Ubicación del Proyecto
Fuente: Autor

Agroindustrial el Corazón se encuentra ubicado en las coordenadas: 742592 N; 10026568 O correspondientes a la zona 17S del sistema de proyección de coordenadas geográficas UTM (Universal Transverse Mercator).

Este proyecto minero se encuentra en el cantón Santa Ana de Cotacachi, comunidad el Corazón perteneciente a la parroquia García Moreno, el proyecto capta el agua de la vertiente Manduriacu y deposita sus residuos líquidos en la vertiente Río verde o también conocida como Río Tortugo.

3.2. Materiales y Metodología De La Investigación

3.2.1. Diseño Experimental

Esta investigación utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), tomando como punto de partida una muestra extra de agua residual de la empresa AIC. El diseño experimental consistió en la aplicación de tres tratamientos con tres repeticiones cada uno dando un total de 9 unidades experimentales (UE).

Tabla 2. *Tratamientos aplicados y el total de unidades experimentales.*

Repeticiones	Primer Tratamiento (Oxigenación o burbujeo)	Segundo Tratamiento (Bioaumentación)	Tercer Tratamiento (Estimulación)
1	(UE-1)	(UE-4)	(UE-7)
2	(UE-2)	(UE-5)	(UE-8)
3	(UE-3)	(UE-6)	(UE-9)

Fuente: Autor

3.2.2. Toma de Muestras

Para la toma de muestras se realizó un muestreo simple puntual; es decir se tomó un total de 10 muestras de la piscina 10C, actualmente lugar que recibe todos los residuos tanto líquidos como sólidos del proceso de extracción de oro.

El muestreo se realizó a las 9:00am para mejorar el lapso de tiempo desde la toma in situ hasta llevarlas al laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCE-SI) ubicada en la provincia de Imbabura y al Laboratorio acreditado por el SAE (Servicio de Acreditación Ecuatoriano), GRUENTEC Cía. Ltda instalaciones destinadas a realizar los análisis de metales pesados y cianuro en la ciudad de Quito.

Las muestras de agua se transportaron a dos diferentes lugares a una temperatura de 4°C, las muestras que fueron al Laboratorio de Biotecnología de la PUCE-SI se colocaron en botellones de plástico de 6L de capacidad cada uno, previamente desinfectados con Cloro, las muestras enviadas al Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda fueron colocadas en un envase de vidrio ámbar de 500ml de capacidad para el análisis de Cianuro y una botella de plástico hermética entregada previamente por el Laboratorio para el análisis de metales pesados.

Una vez llegadas las muestras de agua al Laboratorio de Biotecnología de la PUCE-SI, estas fueron ubicadas en una estantería que contenía iluminación y bombas de aire, con un sistema de mangueras previamente preparadas para cada botellón, en la parte superior de la estantería se ubicó tres botellones pertenecientes al primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo, para el segundo tratamiento: Bioaumentación, se preparó con anterioridad las cepas bacterianas que iban hacer aplicadas, y por último en el tercer tratamiento: Estimulación, se realizó un balance de masas en el que se involucró tanto a las cepas bacterianas como al medio de cultivo de las mismas.

Se envió al laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda las primeras muestras de agua el día veinte y cinco de mayo del 2017, estos resultados fueron nuestro testigo, siete días después cuando las muestras de agua ya habían estado en contacto con sus respectivos tratamientos, se procedió a preparar los envases con preservantes entregados por el laboratorio, esto con el fin de conservar las muestras durante su transporte y se procedió al segundo envío el día viernes dos de junio del 2017, estas servirían para nuestro monitoreo, siete días después el día viernes nueve de junio del 2017 se enviaron las terceras muestras, igual muestras de monitoreo, el día diez y seis de junio del 2017 se enviaron las muestras finales de agua.



Figura 2. Envases entregados por el laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.
Fuente: Autor

El laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda para la determinación de Cianuro Total utiliza el Análisis de flujo segmentado, Método SM 4500 CN y para el Análisis de metales pesados, utiliza el método de metales por ICP-MS (plasma inductivo acoplado y espectrometría de masas).

3.2.3. Determinación de Cianuro Total por Análisis de flujo segmentado, Método SM 4500 CN.

Esta técnica se utilizó para analizar la concentración de Cianuro (CN⁻) presente en las muestras. Los análisis fueron realizados por el laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda., acreditado por el SAE (Servicio de Acreditación Ecuatoriano), N°: (OAE LE 2C 05-008), este laboratorio se encargó del envío de frascos adecuados para el traslado de las muestras como también de los preservantes necesarios para mantener la calidad de las diferentes muestras.

3.2.4. Análisis de metales pesados, Método de metales por ICP-MS (plasma inductivo acoplado y espectrometría de masas).

Existen cerca de 90 elementos conocidos como traza que se encuentran en las rocas y minerales y son detectados en concentraciones <0.1% en peso (equivalente a 1000ppm). (Almaguer Rodríguez, J. D. L. 2014).

Para el desarrollo de la investigación tres metales fueron determinados para ser analizados, estos son: Cromo (Cr), Mercurio (Hg) y Plomo (Pb), esto debido a que son elementos químicos producto resultante de la actividad minera en el proceso de extracción de oro.

El laboratorio se encargó del envío de frascos adecuados para el traslado de las muestras como también de los preservantes necesarios para mantener la calidad de las mismas.

3.3.Determinación de las técnicas

Las muestras fueron enviadas al laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda., este laboratorio en el desarrollo de los análisis utiliza las técnicas anteriormente mencionadas las cuales se basan en lo siguiente:

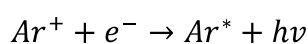
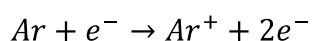
3.3.1. Análisis de flujo segmentado, Método SM 4500 CN.

El laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda en sus diferentes procesos utiliza un análisis de flujo segmentado el cual se basa en lo siguiente: al ser un análisis automático continuo, las muestras son aspiradas secuencialmente y entre ellas se insertan burbujas de aire que segmentan (separan físicamente) el flujo. Estas burbujas evitan la contaminación entre muestras sucesivas, impiden la dispersión de la muestra en el portador y facilitan la mezcla entre la muestra y los reactivos, favoreciendo que se alcance el equilibrio físico y químico antes de la llegada al detector, el sistema tiene una unidad de eliminación de burbujas antes del detector para impedir la posible interferencia de las mismas en la medida analítica.

El procedimiento automatizado para la determinación de cianuro total se basa en la siguiente reacción: el complejo unido cianuro se descompone en una corriente que fluye continuamente a un pH de 3,8 por el efecto de la luz UV. Una lámpara de UV-B (312 nm) y una espiral descomposición de vidrio de borosilicato se utilizan para filtrar la luz UV con una longitud de onda inferior a 290 nm, evitando así la conversión de tiocianato en cianuro. El cianuro de hidrógeno a un pH de 3,8 se separa por destilación en línea a 125 ° C bajo vacío. (GRUENTEC Cía. Ltda., 2010).

3.3.2. Método de metales por ICP-MS (plasma inductivo acoplado y espectrometría de masas).

Este método consiste en introducir al equipo las muestras por medio del Autosampler, después de haberse efectuado un adecuado pre-tratamiento. La muestra líquida es convertida a un aerosol mediante un nebulizador y pasa a través de una cámara de pulverización a 0-2 °C. Posteriormente las gotas ligeras de aerosol son sometidas a temperaturas altas mediante un plasma de argón donde son atomizadas e ionizadas. La generación del plasma se consigue sometiendo un flujo de gas, que se conoce como gas plasmógeno (usualmente argón), a la acción de un campo magnético oscilante, inducido por una corriente que oscila a alta frecuencia. En el proceso de generación del plasma, los iones de argón y los electrones libres presentes son acelerados siguiendo trayectorias anulares, debido a la alternancia del campo magnético presente producido por el generador de radiofrecuencia. Coexistiendo con el plasma se encuentra al menos las siguientes especies iónicas: electrones (e^-), iones de argón (Ar^+), átomos de argón en estado fundamental (Ar^0), átomos de argón excitados (Ar^*), moléculas de argón ionizadas (Ar^{2+}), neutras (Ar^{20}) y excitadas (Ar^{2*}). Es de esperar que se produzcan procesos de recombinación radiante del tipo:



Este tipo de procesos explica el hecho de que el plasma aparenta ser una llama, cuando en realidad no lo es, no existe ningún proceso de combustión química convencional en el proceso de generación. El plasma es usado como una fuente muy eficaz de iones en su estado M^+ , los cuales se forman mediante colisiones con átomos e iones excitados de argón. Estos átomos o moléculas ionizadas viajan a través de una interface a la cámara octopolar ORS para reducir interferencias, luego entran a la cámara de filtro de masas cuadrupolar y finalmente al detector.

La detección ICP-MS se logra mediante la manipulación de las partículas ionizadas cargadas. Cada partícula ionizada es direccionada por el campo electromagnético en la cámara de filtro de masas cuadrupolar donde son seleccionados átomos o moléculas cargados y dependiendo de la relación m/z (masa/carga), son direccionados a un detector tipo multiplicador de electrones. Estas masas pueden ser cuantificadas comparando con una curva de calibración o conociendo las respuestas de estándares internos que están cercanos en masa y/o potencial de ionización. (GRUENTEC Cía. Ltda., 2010)

- **Pre-tratamiento**

En caso de medir metales disueltos en agua, es necesario filtrar las muestras y preservarlas con ácido nítrico. En caso de medir metales totales (solubles en ácido), por ejemplo en agua subterránea, soluciones acuosas, desechos industriales, suelos, lodos, sedimentos o desechos sólidos es necesario aplicar una digestión ácida previa a la medición. Un pretratamiento será necesario en el caso de un contenido elevado de sólidos suspendidos ($>0.2\%$), compuestos orgánicos, etc. (GRUENTEC Cía. Ltda., 2010).

- **Procesamiento de muestras**

Muestras que no necesitan digestión serán analizados directamente, si no exceden 0.2% de sólidos suspendidos. Muestras que exceden esta cantidad deben ser centrifugadas (5-10 min @ 3000rpm) o filtradas. Todas las diluciones y muestras deben ser introducidas en el equipo con al menos 1% HNO_3 y 0.5% HCl , tomando en cuenta la concentración real del ácido. (GRUENTEC Cía. Ltda., 2010).

3.4. Análisis Físico Químicos

Los parámetros de calidad de agua que fueron tomados en cuenta para la investigación fueron hechos a nivel in-situ (en laboratorio) y se detallan a continuación:

DQO (Demanda Química de Oxígeno):

Para este parámetro se utilizó el colorímetro marca LaMotte® SMART2. Se inició inoculando 2ml en tubos de ensayo con una solución digestora de Dicromato de Potasio

($K_2Cr_2O_7$) y Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), posteriormente se colocó los tubos en un termoreactor a una temperatura de $180^\circ C$ por un lapso de tiempo de 180 minutos.

Finalizado el proceso de digestión se procedió a la lectura del blanco y se analizó las diferentes muestras. Este análisis se realizó tres veces durante la duración de la investigación, la primera muestra fue al inicio del ensayo para tener un punto de partida, la segunda muestra fue al aplicar los diferentes tratamientos para tener un seguimiento del desarrollo de la investigación, y una muestra final para saber que tratamiento fue el mejor.

DBO₅ (Demanda Biológica de Oxígeno):

Para este análisis se tuvo precaución al momento de la toma de muestras, debido a que no debe existir vacíos en los recipientes contenedores de las muestras con el fin de evitar posibles aireaciones, que podrían afectar los resultados, es por esta razón que los envases fueron llenados hasta el borde con las muestras de agua, luego fueron sellados, etiquetados y se colocaron en un contenedor termo-aislado a $4^\circ C$.

Para el análisis respectivo se colocó 50 ml de las muestras de agua en 10 envases de vidrio ámbar el cual evita fotorreacción celular bacteriana, se añadió 1ml de las siguientes soluciones para brindar nutrientes necesarios a los microorganismos:

- Solución (a) amortiguadora de fosfatos: 8,5g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 21,75g de fosfato dipotásico (K_2HPO_4); 33,4g de fosfato de disódio heptahidratado (Na_2HPO_4)* $7H_2O$ y 1,7g de cloruro de amonio (NH_4Cl).
- Solución (b) de sulfato de magnesio heptahidratado 22,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O/l$.
- Solución (c) de cloruro de calcio 27,5g $CaCl_2/l$.
- Solución (d) de cloruro férrico hexahidratado 0,2 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O/l$.

Una vez colocadas todas las soluciones se introdujo un agitador magnético dentro del envase ámbar y en un capuchón plástico se colocó 1,5g de Hidróxido de Sodio ($NaOH$) se, esto se colocó en la boquilla del recipiente, y se selló mediante un “BOD Analyzer” u Oxitop. Los envases fueron colocados sobre un agitador eléctrico dentro de la incubadora a $20^\circ C$ por un período de 5 días. Las lecturas correspondientes fueron anotadas al quinto día del ensayo. Este análisis se realizó tres veces al igual que el DQO con el fin de tener un registro al inicio en el desarrollo y al final del ensayo.

Color:

Para este parámetro se utilizó el colorímetro modelo LaMotte® SMART2, para iniciar se leyó el blanco con el cual se calibra el equipo, posteriormente se analizó 10 ml de cada muestra, este análisis se realizó tres veces durante la duración de la investigación, la primera muestra fue al inicio del ensayo para tener un punto de partida, la segunda muestra fue al aplicar los diferentes tratamientos para tener un seguimiento del desarrollo de la investigación, y una muestra final para saber que tratamiento fue el mejor.

Turbidez:

Este parámetro fue analizado con un Turbidímetro Nefelométrico Portátil LaMotte® Modelo 2020. Con el cual se procedió a realizar la lectura del blanco para calibrar el equipo y posteriormente analizar 10mL de las muestras y obtener los resultados. Este análisis se realizó tres veces durante la duración de la investigación, la primera muestra fue al inicio del ensayo para tener un punto de partida, la segunda muestra fue al aplicar los diferentes tratamientos para tener un seguimiento del desarrollo de la investigación, y una muestra final para saber que tratamiento fue el mejor.

pH:

Para este parámetro se utilizó un potenciómetro ExStik Modelo PH100 a base de un electrodo que ayuda a determinar soluciones alcalinas y ácidas. Este análisis se realizó cuatro veces durante la duración de la investigación, la primera muestra fue al inicio del ensayo para tener un punto de partida, la segunda y tercera toma de muestra fue al aplicar los diferentes tratamientos para tener un seguimiento del desarrollo de la investigación, y una muestra final para saber que tratamiento fue el mejor.

Conductividad eléctrica:

Se utilizó un conductímetro, modelo ExStik EC400 que también mide sólidos disueltos totales (SDT), salinidad y temperatura modelo, Este análisis se realizó cuatro veces durante la duración de la investigación, la primera muestra fue al inicio del ensayo para tener un punto de partida, la segunda y tercera toma de muestra fue al aplicar los diferentes tratamientos para tener un seguimiento del desarrollo de la investigación, y una muestra final para saber que tratamiento fue el mejor.

3.5. Aislamiento de microorganismos

Se procedió a tomar muestras de agua, de la vertiente de la cual se capta el agua antes de ingresar a la empresa AIC y de la piscina 10C lugar que almacena los residuos tanto sólidos como líquidos del proceso de extracción del oro, estas muestras fueron trasladadas al laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

Para la preparación de las cepas bacterianas se colocó en 12 tubos de 5ml caldo nutritivo (Nutrient Broth) de fórmula estandarizada FDA/BAM (Foods and Drugs Administration/Bacteriological Analytical Manual) previamente esterilizados en el autoclave a (121°C y 1.5 atm por 40 minutos) en cada tubo se colocó 1ml de muestra y se selló con algodón, se trabajó cerca del mechero en un ambiente estéril evitando cualquier tipo de contaminación. Las cepas bacterianas fueron incubadas a 35°C por un lapso de 24 horas, esto para su posterior utilidad en la obtención de bacterias y también en el proceso de extracción de ADN.

Transcurrido el tiempo de incubación las cepas bacterianas fueron aisladas en placas Petri preparadas con agar nutritivo (Nutrient Agar) LAB 008, y mediante el método de siembra de agotamiento por estrías se distribuyó por toda la superficie de la placa las bacterias obtenidas, a partir de este paso podemos obtener las colonias. Una vez realizada la siembra, las placas Petri fueron incubadas a 35° C por 72 horas.



Figura 3. *Método de siembra de agotamiento por estrías.*

Fuente: Autor

Con ayuda del aza y trabajando cerca al mechero se procedió a cultivar las cepas bacterianas presentes en las placas Petri, para esto se preparó 12 tubos de ensayo que contenían caldo nutritivo (Nutrient Broth) previamente esterilizado y se colocó las diferentes bacterias dentro de los tubos, los cuales después de su adecuada incubación serían aplicados a los diferentes tratamientos del proyecto.

3.6. Caracterización Molecular

Se realizó por medio de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) con un equipo Cipher para cassette dual de GBS Scientific Equipment©.

Para esto se preparó con anterioridad una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la región V3 de la secuencia del ADNr 16s. La DGGE se ejecutó en un gradiente de desnaturización del 20% al 60% para la extracción de bandas, purificación, amplificación y posterior secuenciación e identificación de las cepas presentes en las muestras” (León, 2013; Escalante, 2006).

3.7. Extracción de ADN

Para el proceso de extracción de ADN bacteriano se utilizó las cepas bacterianas anteriormente aisladas y con ayuda del kit comercial PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen[®]) se procedió a la extracción de ADN. El kit contiene 7 reactivos que son (Genomic Lysis/Binding Buffer, Genomic Digestion Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Genomic Elution Buffer, RNase A y Proteinase K) todos necesarios para una adecuada extracción.

Protocolo para la extracción de ADN:

Para iniciar se preparó el lisado de bacterias, esto consistió en colocar en un tubo Eppendorf de 2ml la cantidad de 1.5 ml del cultivo bacteriano, se centrifugó a 10.000 revoluciones durante 1 minuto, obteniendo un pellet (Se repitió este paso 3 veces para obtener un mejor resultado). Después de obtener el pellet se colocó las células bacterianas en 200 μ L de Lysozyme Digestion Buffer solución compuesta por (Tris-HCl 25 mM, pH 8, 2,5 mM EDTA, Triton X-100 al 1%) con una concentración final de Lisozima de 20 mg.mL⁻¹. A esta mezcla se la colocó en el equipo de vórtex por 5 segundos para una mejor unión posteriormente se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se añadió al preparado 20 μ L del reactivo Proteinase K y se mezcló rápidamente por agitación, se colocó 200 μ L del reactivo Genomic Lysis/Binding Buffer, se mezcló en el equipo de vórtex por 5 segundos y se colocó a incubar a 55 °C durante 30 minutos. Finalmente se agregó 200 μ L de etanol (96-100%) se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

El siguiente paso fue la unión de ADN para lo cual transfirió 640 μ L del lisado (solución homogénea) a un tubo de recogida, se colocó los diferentes tubos a la centrifuga por un minuto a una velocidad de 10.000 rpm a temperatura ambiente. Se desechó el tubo de recolección y se colocó el contenido en un nuevo tubo de recolección de 2ml.tubos proporcionados por el Kit, se añadió 500 μ L del reactivo Wash Buffer 1 y se centrifugó a 10.000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente. El tubo de recolección con el flujo obtenido fue descartado y se colocó el contenido en un nuevo tubo de recolección, se añadió 500 μ L del reactivo Wash Buffer 2 y se centrifugó a velocidad máxima durante 3 minutos, este proceso se llevó acabó con el fin de lavar el ADN.

Finalizado el proceso de centrifugación se procedió a la Elución de ADN para lo cual se desechó el tubo de recolección y el contenido fue colocada en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml. Se adiciono 100 μ L del reactivo Genomic Elution Buffer y se incubó a temperatura ambiente por el lapso de un minuto, a continuación se procedió a centrifugar a velocidad máxima durante un minuto, se descartó el tubo de recolección y el ADN purificado quedó contenido en el tubo Eppendorf el cual fue refrigerado a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8. Amplificación del gen ADNr 16s

Por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó la amplificación del gen ADNr 16s. Para lo cual se utilizó los partidores universales P3 (341f) y 907r (926r) para el dominio de bacterias.

Para cada reacción de PCR el volumen total utilizado debe ser de 25 μ l, obteniendo una concentración ideal de ADN de 10n molar/ μ l, los 25 μ l se repartieron de la siguiente manera:

Tabla 3 *Reactivos utilizados para la PCR.*

<i>REACTIVOS</i>	<i>VOLUMEN</i>
Taq Polimerasa	12,5 μ l
Partidores 907r (926r a una concentración de 0,10 μ M)	1 μ l
P3 (341f a una concentración de 0,10 μ M)	1 μ l
ADN	5 μ l
Agua libre de nucleasas (DNase, RNase)	5,5 μ l
VOLUMEN TOTAL	25 μl

Fuente: Autor

Dentro del termociclador Multigene Optimax de Labnet. Se realiza la amplificación del ADN. Que consiste en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; luego 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, seguido de esto un alineamiento a $55,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos y una elongación a 72°C por 90 segundos. Posteriormente realiza otro proceso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos seguido de un alineamiento a

55,6°C por 45 segundos y como último paso realiza una extensión final a 72°C por 90 segundos.

3.9. Análisis DGGE (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización)

Después de obtener la amplificación del gen ADN este es sometido a una electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).

Este procedimiento sirve para separar las diferentes bandas OTU's (Unidades operacionales taxonómicas) existentes en las muestras de los diferentes tratamientos; el gel contenía un gradiente de desnaturalización del 20% al 60% preparado según el protocolo, con las soluciones stock que se encuentran en la Tabla 2.

Este paso se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la PUCESI con el equipo DGGEK-1001 (C.B.S Scientific Company[®]). Este equipo posee una cámara de electroforesis vertical cargada con aproximadamente 20 litros de buffer TAE 1X Solución que contiene (40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA, pH 8.3 a 25°C). El casete que contiene los geles es sumergido y bañado en esta solución, por un lapsus de doce horas.

3.9.1. Preparación del gradiente desnaturalizante.

Para la elaboración del gradiente desnaturalizante se utilizaron 15mL de cada solución stock en tubos cónicos tipo "Falcon" cubiertos por papel aluminio para evitar la fotorreacción de los reactivos.

Para el proceso de polimerización de la acrilamida se preparó una solución de 50mg de persulfato de amonio (Promega[®]) contenidos en 500 µL de agua Mili-Q estéril, de los cuales; 130 µL fueron utilizados además también de 13 µL de N-Tetra-metil-etilendiamina [TEMED] (SantaCruzBiotechnology[®]). El gradiente vertical se obtuvo utilizando el formador de gradiente de proporcionado por el fabricante del equipo Cipher DGGEK-1001 (C.B.S Scientific Company[®]).

Se utilizó una jeringa Hamilton[®], para colocar las preparaciones dentro del casete, la preparación consistió en 15 µL de los productos de la PCR de los partidores (907r-P3f)

fueron cargados al gel mezclándolos previamente con 3 μ L de buffer de carga (6X Load Dye Promega[®]) en una relación de 3:1.

Finalmente para la electroforesis se debe tomar en cuenta los siguientes parámetros: voltaje de 85 v (voltios), 500 A (Amperios) durante el lapso de tiempo de 660 minutos y a una temperatura de 60°C.

Tabla 4. Preparación de las soluciones stock de DGGE.

	20%	60%
Acrilamida Bis 40%(ml)	18.8	18.8
TAE 40X (ml)	2.5	2.5
Formamida (ml)	8	24
Urea (g)	8,4	25,2

Fuente: Autor

3.9.2. Proceso de tinción y separación de OTU's (Unidades Operacionales Taxonómicas).

Para la tinción del gel se utilizó 15 ml de solución TAE 1.6X y 3 μ L de colorante Diamond[™] (Nucleic Acid Dye Promega[®]) en un tubo cónico tipo "Falcon". Se utilizó también una jeringa quirúrgica estéril que esparcía la mezcla por todo el casete y se dejó reposar por 60 minutos en oscuridad.

Finalizado el proceso de tinción se colocó el gel en el transiluminador UV LabNet[™] Inc. para visualizar las bandas y poder separar las OTU's más representativas del ensayo. Se fotografió con una cámara digital SONY[®] DSC-HX400V de 20.4MP para tener un registro de los patrones de las bandas y poder someter los resultados del ensayo a un análisis informático.

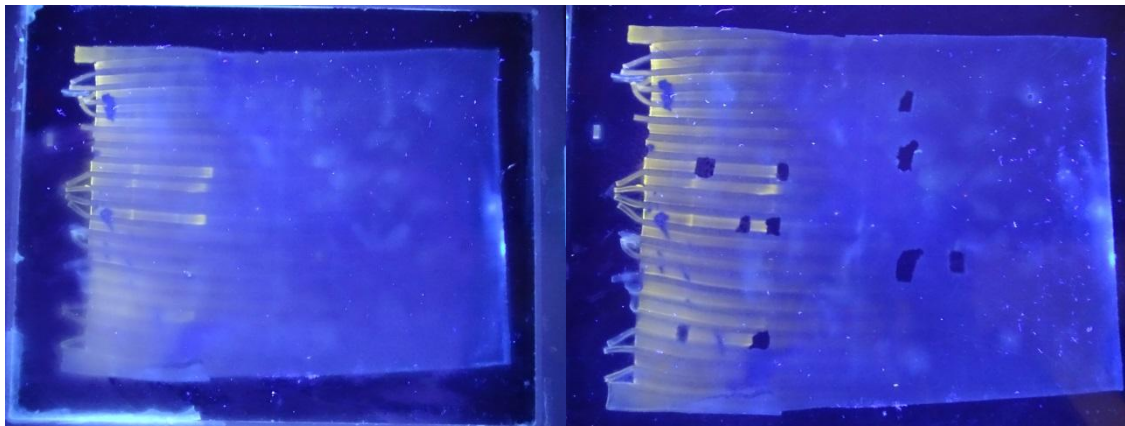


Figura 4: Visualización de las bandas en el transiluminador UV LabNet™ Inc. Y separación de las OTU's más representativas

Fuente: Autor

Cada banda fue cortada y colocada en tubos Eppendorf® de 1.5 ml para su purificación. En cada tubo se colocó 50µL de agua mili-Q estéril y fueron sometidos a baño maría a 65 °C por 15 minutos, posteriormente fueron centrifugados a 10000 rpm por 30 segundos. Al finalizar las secuencias obtenidas fueron re amplificadas y secuenciadas por MacroGen Inc.

CAPITULO IV

4. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tres tratamientos fueron aplicados a las 9 muestras de agua de la empresa AIC, esto durante un lapso de tiempo de 22 días, para el análisis de metales pesados y cianuro se procedió a enviar las muestras cada 7 días al laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda, para los análisis in situ se procedió; al inicio, después de 11 días para poseer una línea base y al final del proceso de investigación.

El ensayo realizado para determinar el mejor tratamiento de biorremediación, indicó que los tres tratamientos aplicados; Oxigenación, Bioaumentación y Estimulación son capaces de reducir la concentración de metales pesados y cianuro total, sin embargo el segundo tratamiento: Bioaumentación presentó mayor capacidad de reducción que los demás.

Se realizó la prueba de normalidad (Shapiro Wilk) en base a las concentraciones obtenidas al final del ensayo, esta prueba indico que los datos si se distribuyen normalmente, dando paso a la realización del análisis estadístico ANOVA.

4.1. Resultados obtenidos de los análisis de Cianuro (CN⁻)

Los tres tratamientos aplicados a la investigación resultaron ser eficientes en la disminución de Cianuro, sin embargo unas muestras presentaron mayor reducción que otras. El seguimiento al ensayo, se realizó midiendo la concentración de Cianuro en las diferentes unidades experimentales, de manera periódica, cada 7 días, durante 22 días que duró el ensayo.

Los resultados obtenidos de la reducción de cianuro se muestran a continuación en la figura 5 tomando en cuenta la concentración inicial y la reducción obtenida en todas las unidades experimentales durante el envío de muestras al laboratorio. De igual manera se puede identificar que muestras de agua obtuvieron mejor respuesta durante el ensayo.

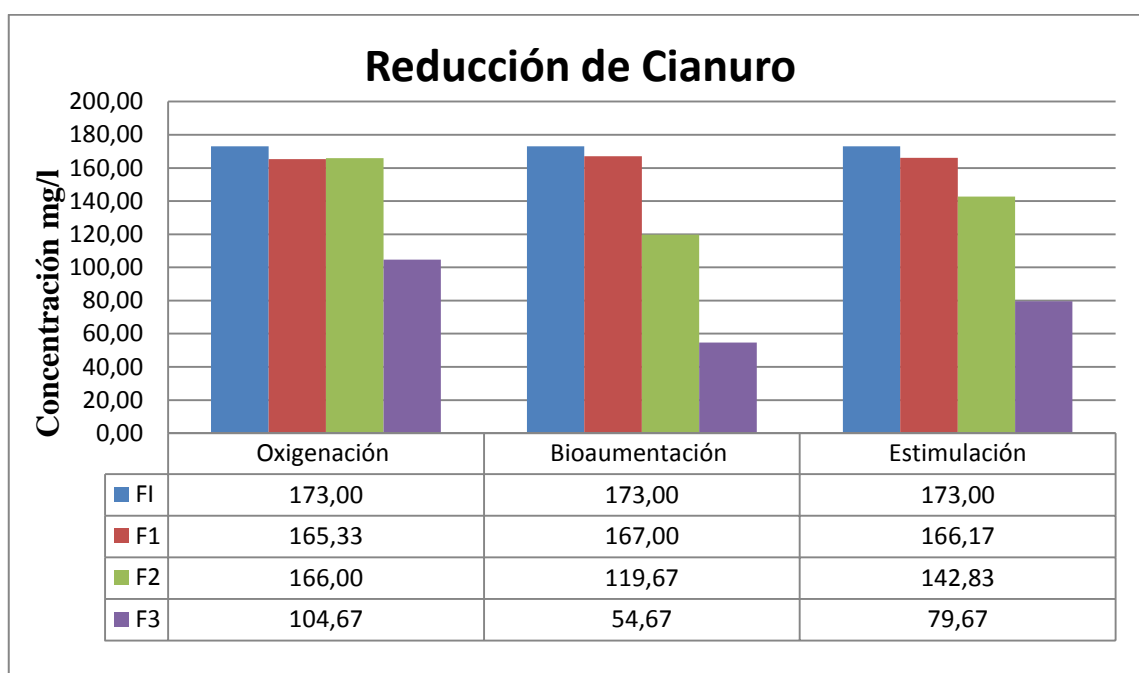


Figura 5. Gráfica de la concentración de Cianuro (CN⁻) en los diferentes tratamientos de remediación aplicados a la investigación.

Fuente. Autor

Los resultados demostraron que existe una disminución en las concentraciones de todas las unidades experimentales. Al inicio del ensayo el veinte y cinco de mayo del 2017 obtuvimos una concentración de 173 mg.l⁻¹ y al final del ensayo a los 22 días obtuvimos un promedio de reducción para cada tratamiento de 104,67 mg.l⁻¹ Oxigenación o Burbujeo, 54,67 mg.l⁻¹ en Bioaumentación y 79,67 mg.l⁻¹ en Estimulación.

El porcentaje de reducción obtenido por el primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo fue de 39,49%, 68,40% para el segundo tratamiento y para el tercer tratamiento fue de 19,65%. Demostrando así que existe una reducción notoria en los niveles de contaminación por Cianuro (CN⁻) en el agua residual tomada de la empresa AIC por la efectividad de los diferentes tratamientos.

4.1.1. Análisis estadístico de reducción de Cianuro (CN⁻)

El análisis estadístico ANOVA de la concentración final de Cianuro, señala que existe diferencias significativas (**) entre los tratamientos aplicados a las unidades experimentales. Además el porcentaje de coeficiente de variación es de 21,52% determinando un muestreo adecuado de los datos en estudio.

Tabla 5. ANOVA de la concentración final de Cianuro durante el ensayo

ANOVA					F tabulado			
FC	GL	SC	CM	Fcal	F 0,05	F0,01	P value > 0,05	Sig
Tratamientos	11	43150,97	3922,82	4,19	2,22	3,09	0,6777	**
Error exp	24	22449,33	935,39					
Total	35	65600,31						

CV= 21,52%

Fuente. Autor

FV = Factor de varianza, SC = Sumatoria de cuadrados, GL= Grados de libertad, CM=Cuadrado medio, CV= Coeficiente de variación.

Se realizó la prueba Tukey al 5% (Figura 6) la cual determinó la presencia de 4 grupos diferentes: Inicio (d), T. Estimulación (c), T. Oxigenación (b) y T. Bioaumentación (a), este análisis nos indica que existen diferencias significativas entre la concentración inicial de Cianuro y las concentraciones finales de los tres diferentes tratamientos aplicados durante la investigación, obteniendo como mejor tratamiento el de Bioaumentación.

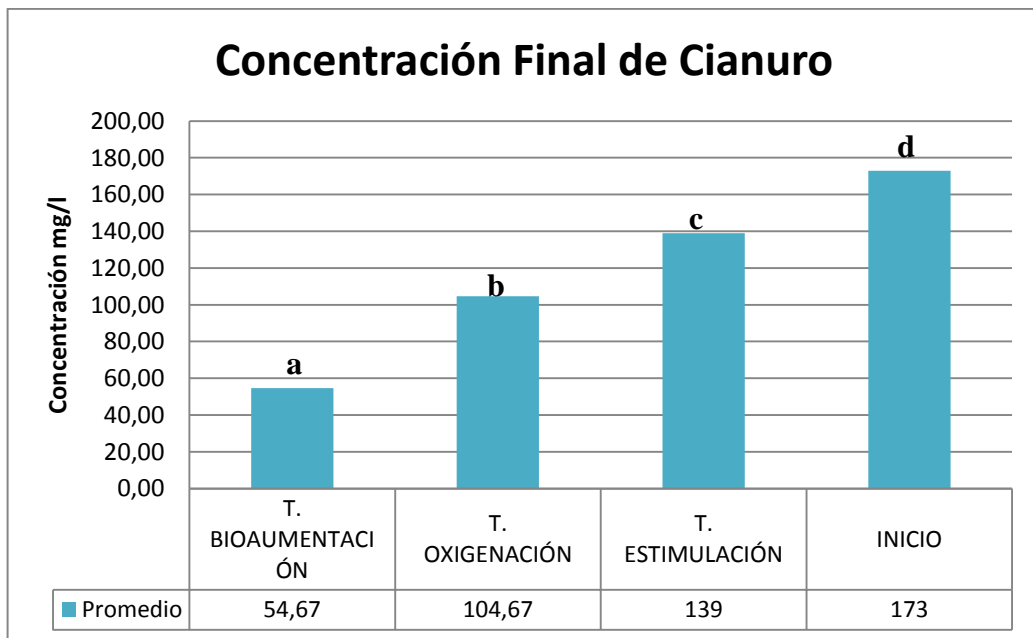


Figura 6. Concentración (mg/l) final de Cianuro al inicio y después de la aplicación de los diferentes tratamientos de remediación, durante el ensayo.

Fuente. Autor

Muchos estudios enfocados a la atenuación natural del CN, han concluido que la concentración de este compuesto disminuye con el tiempo debido a fenómenos de, oxigenación, volatilización, precipitación, adsorción y biodegradación mediada por microorganismos nativos. (Restrepo, O. J., Montoya, C. A., & Muñoz, N. A. (2006).

Según Cabrera, L. (2015). Las bacterias degradan el cianuro de mejor manera en condiciones aeróbicas que en condiciones anaeróbicas, esto debido a que las bacterias utilizan el oxígeno del aire para descomponer los compuestos de cianuro en nitratos, bicarbonatos y sulfatos. Además durante este proceso microbiano las bacterias son capaces de oxidar los complejos de cianuro metálico, los iones metálicos de las especies de cianuro DAD y los subproductos intermedios de la oxidación del cianuro, también la utilización de microorganismos provee de algunas ventajas tales son: la destrucción de todas las formas de cianuro y no se da inhibición en la degradación 27 por la presencia de metales pesados.

Dentro de las técnicas que se han desarrollado para el tratamiento de aguas contaminadas se encuentran la estimulación de los microorganismos autóctonos, esto significa adicionar nutrientes y oxígeno con el fin de acelerar el proceso, al incrementar la población de bacterias de biodegradar los contaminantes. (Pérez, Ó. D. B., *et al.*, 2013)

4.2.Resultados obtenidos de los análisis de Metales pesados

Resultados obtenidos de los análisis de Metales Pesados realizado por el laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda

El los resultados de los metales pesados Cromo (Cr) y Plomo (Pb), no obtuvimos una reducción significativa, ni alteración en los niveles de contaminación durante la aplicación de la tecnología a las diferentes muestras de agua.

Los metales pesados son imprescindibles para el desarrollo de microorganismos, plantas y animales pues ejercen roles importantes en algunas reacciones bioquímicas y son esenciales para su crecimiento y desarrollo (Nessner y Esposito, 2010; Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Sin embargo, cuando se presentan en altas

concentraciones pueden formar compuestos inespecíficos creando efectos citotóxicos y letales. (Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. 2016).

En una investigación realizada por (Azario, R. R. 2014). Nos habla que se ha demostrado que los metales pesados inhiben el crecimiento microbiano y la actividad de enzimas mediante el bloqueo de los grupos funcionales, produciendo cambios en las moléculas biológicas. En ambientes contaminados con metales, las respuestas de las comunidades microbianas dependerán de las concentraciones de los agentes tóxicos a las que estas son expuestas, y a otros factores tales como la naturaleza de los nutrientes, la forma química del agente tóxico, pH, la temperatura, oxígeno. (Azario, R. R. 2014).

El cromo es tóxico y mutagénico para la mayoría de las bacterias, la presencia de otros metales pesados como el plomo y el cadmio, pueden interferir en la acción del cromo dejando como efectos reportados la elongación celular, agrandamiento de las células, e inhibición de la división celular lo que finalmente conduce a la inhibición del crecimiento celular, además también se debe considerar los cambios en la morfología de las bacterias, ya que de forma general, las bacterias gram negativas son más sensibles que las gram positivas. (Azario, R. R. 2014).

4.2.1. Resultados obtenidos de los análisis de Mercurio

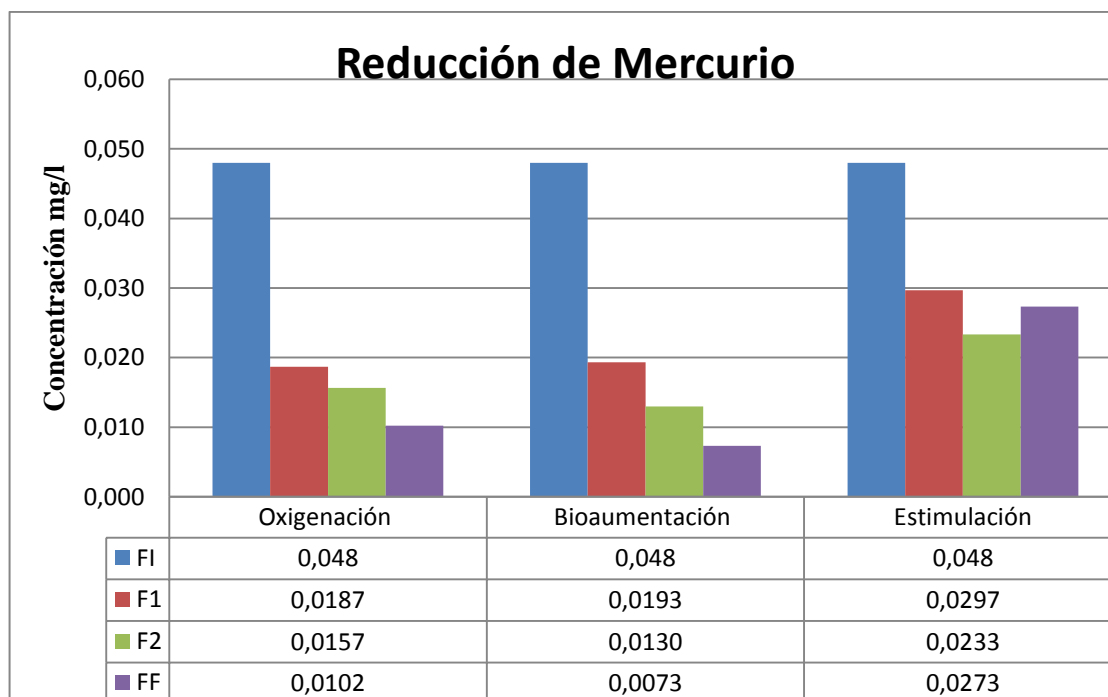


Figura 7. Gráfica del porcentaje de reducción de Mercurio en los diferentes tratamientos aplicados durante la investigación

Fuente: Autor

Como resultado en los análisis tenemos una disminución en las concentraciones de Mercurio en los diferentes tratamientos, al inicio del ensayo el veinte y cinco de mayo del 2017 teníamos una concentración de $0,048 \text{ mg/l.l}^{-1}$, y al final después de los 22 días del ensayo, el diez y seis de junio del 2017 en el tratamiento de Oxigenación tenemos una concentración de $0,0102 \text{ mg/l.l}^{-1}$, con un porcentaje de reducción de 78,67%. En el segundo tratamiento: Bioaumentación obtuvimos una concentración de $0,0073 \text{ mg/l.l}^{-1}$, con un porcentaje de reducción de 84,71% y por último se observó una reducción de $0,027 \text{ mg/l.l}^{-1}$, con un porcentaje reducción de 43,05% para el tercer tratamiento: Estimulación, indicando que desde el inicio de la investigación existe un cambio en la contaminación del agua residual de la empresa AIC.

4.2.2. Análisis estadístico de reducción de Mercurio

El análisis estadístico ANOVA de la concentración final de Mercurio, señala que existe diferencias significativas (**) entre los tratamientos aplicados a las unidades

experimentales. Además el porcentaje de coeficiente de variación es de 21,52% determinando un muestreo adecuado de los datos en estudio.

Tabla 6. ANOVA de la concentración final de Mercurio durante el ensayo

ANOVA					F tabulado			
FC	GL	SC	CM	Fcal	F _{0,05}	F _{0,01}	P value > 0,05	Sig
Tratamientos	11	0,0073356	0,0006668	13,94	2,22	3,09	0,6203	**
Error exp	24	24	0,001148					
Total	35	0,0084840						

CV= 26,90%

Fuente. Autor

FV = Factor de varianza, SC = Sumatoria de cuadrados, GL= Grados de libertad, CM=Cuadrado medio, CV= Coeficiente de variación.

Se realizó la prueba Tukey al 5% (Tabla 6) la cual determinó la presencia de 4 grupos diferentes: Inicio (d), T. Estimulación (a), T. Oxigenación (c) y T. Bioaumentación (b), este análisis nos indica que existen diferencias significativas entre la contracción inicial de Mercurio y las concentraciones finales de los tres diferentes tratamientos aplicados durante la investigación. También esta prueba señala que el mejor tratamiento es el de Estimulación.

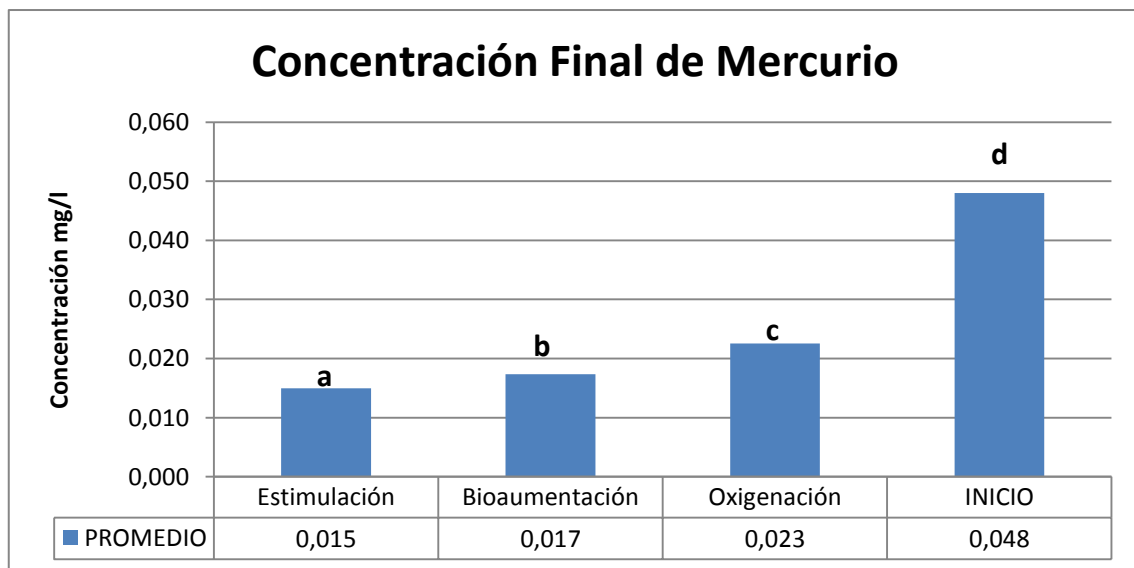


Figura 8. Concentración (mg/l) final de Mercurio al inicio y después de la aplicación de los diferentes tratamientos, durante el ensayo.

Fuente. Autor

Si bien se conoce que las bacterias pueden ligar metales a sus superficies celulares infortunadamente su capacidad natural de ligar metales es generalmente insuficiente para mitigar significativamente la contaminación producida por estos. Sin embargo al adicionar un ambiente estable estos resultados pueden variar. (Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. 2016).

Los microorganismos pueden generar, en presencia de mercurio, mecanismos biológicos de absorción o transformación de los metales por parte de las bacterias. El género pseudomona, es un grupo de bacterias Gram-negativa, de gran actividad remediadora, debido que ellas, realizan procesos de reducción y transformación de hidrocarburos y compuestos contaminantes en el medio.(Vargas Pérez, J. D., Contreras, L., & Alexandra, S. 2011).

Los microorganismos juegan un rol vital en la transformación de elementos traza incluidos los metales ya que influyen su biodisponibilidad y remediación, pueden alterar la toxicidad, solubilidad en agua y la movilidad del elemento, además si se adiciona alimento y un ambiente propicio para su desarrollo los microorganismos pueden mejorar en una cantidad considerable la reducción en aguas contaminadas. (Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. 2016).

4.3. Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales

Para el análisis de resultados de los parámetros físico químicos y de calidad de aguas se tomó en cuenta el TULSMA libro VI Anexo I que nos indica los valores máximos permisibles para la descarga de residuos a un cuerpo de agua dulce. Estos valores fueron comparados con los resultados obtenidos.

- **Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo**

Tabla 7. Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas del primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo

Parámetros	pH [H3O] ⁺	Conductividad [μS/cm]	DBO [mg/L]	DQO [mg/L]	Color [U.C.*]	Turbidez [NTU*]
Muestra Inicial	9,39	1699	86	297	441	69,35
Muestra 1 inicio	8,94	1615	113	447	719	63,12
muestra 1 final	8,8	1632	86	367	1329	126,35
Muestra 2 inicio	9,1	1628	75	309	693	61,38
muestra 2 final	8,98	1649	102	343	1433	138,83
Muestra 3 inicio	9	1635	102	578	746	66,29
muestra 3 final	8,81	1644	81	321	1140	107,23
TULSMA LIBRO VI ANEXO I	5-9	2000	100	250	* Inapreciable en dilución 1/20	10

*U.C: Unidades de Color/ NTU: Unidades Nefelométricas de turbidez.

Nota: Fuente: TULSMA LIBRO VI ANEXO I

Elaborado por: Pamela Valenzuela, Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas

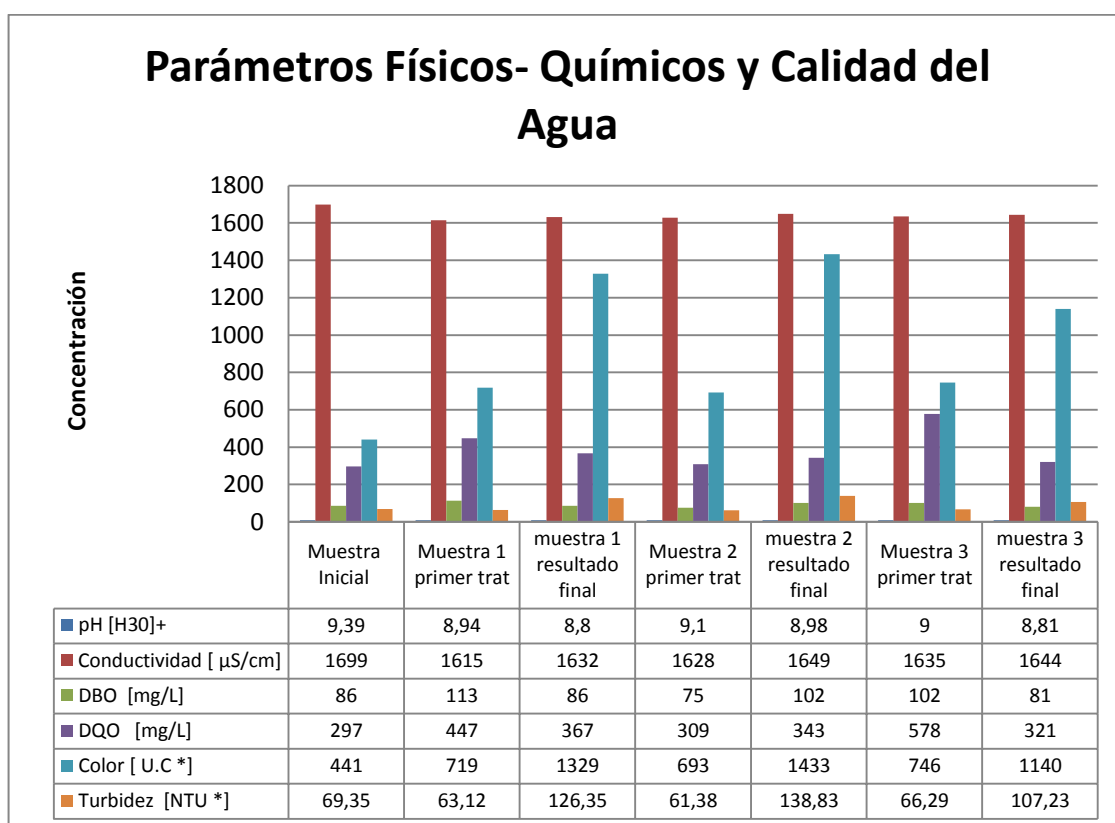


Figura 9. Gráfica de los Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas del primer tratamiento: Oxigenación o Burbujeo

Fuente: Autor

El pH de nuestra muestra inicial, debido a el contenido de metales pesados y cianuro se encuentra fuera de los límites del rango máximo permisible para la conservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces, con un 0,39 fuera del rango aceptable esto debido a los diferentes compuestos químicos que se colocan durante el proceso de extracción de oro. En comparación con las tres repeticiones del primer tratamiento obtuvimos un pH dentro del rango permisible por el TULSMA, obteniendo un resultado final de; (8,8), (8,98), (8,81) respectivamente para cada muestra tratada.

Para la conductividad tenemos un resultado aceptable en todas las muestras ya que la cifra obtenida está dentro de los límites máximos permisibles con referencia para la contaminación de un cuerpo de agua.

La demanda química de oxígeno (DQO) demuestra la cantidad de sustancias disueltas en el agua que pueden ser oxidadas únicamente por medios químicos y que está relacionada con

la demanda bioquímica de oxígeno (DBO); esta mide la cantidad de oxígeno consumido que tiende a degradarse u oxidar por medios biológicos. Ambos parámetros son utilizados como referencia para determinar la contaminación de un cuerpo de agua. En la tabla 7 tenemos una relación que nos indica la proporción de DQO sobre DBO la cual en el resultado final de las tres repeticiones del tratamiento se mantiene dentro del rango permisible de descargas de residuos a cuerpos de agua dulce, siendo mayor la DQO (sobrepasando el límite máximo permisible), indicando que las especies químicas disueltas o en suspensión que se encuentran en las muestras de agua cohiben el crecimiento bacteriano y a su vez la capacidad de oxidar o consumir la materia orgánica presente en las diferentes muestras de agua.

La concentración de Color Real encontrado en la muestra inicial sobrepasa los niveles máximos permisibles (Inapreciable en dilución 1/20), con un valor de 441 U.C, pero el resultado obtenido en las repeticiones del tratamiento obtuvimos valores más elevados, 1329 U.C para la muestra 1, 1433 U.C para la muestra 2 y 1140 U.C para la muestra 3, esta variación se debe a la presencia de sedimentos y demás compuestos químicos que son parte del agua residual de la empresa AIC. La turbidez se encuentra ampliamente relacionada con este parámetro; los resultados obtenidos indican que el agua perteneciente a la muestra inicial no cumple con los límites máximos permisibles (10 NTU), por sobrepasar el límite al tener una concentración de 69,35 NTU. Las muestras 1,2 y 3 tienen valores que van desde 126,35NTU., 138,83 NTU., y 107,23 NTU respectivamente.

- **Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales segundo tratamiento: Bioaumentación**

Tabla 8. *Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas segundo tratamiento: Bioaumentación*

Parámetros	pH [H3O] ⁺	Conductividad [μ S/cm]	DBO [mg/L]	DQO [mg/L]	Color [U.C.*]	Turbidez [NTU*]
Muestra Inicial	9,39	1699	86	297	441	69,35
Muestra 4 segundo trat	8,92	1666	129	466	890	81,56
muestra 4 resultado final	8,86	1699	75	324	473	40,57
Muestra 5 segundo trat	9,03	1689	151	437	588	53,38
muestra 5 resultado final	8,67	1679	86	402	1348	125,99
Muestra 6 segundo trat	9,03	1699	113	632	3567	411,24
muestra 6 resultado final	8,68	1794	91	214	2922	310,69
TULSMA LIBRO	5-9	2000	100	250	*	10
VI ANEXO I					Inapreciable en dilución 1/20	

*U.C: Unidades de Color/ NTU: Unidades Nefelométricas de turbidez.

Nota: Fuente: TULSMA LIBRO VI ANEXO 1

Elaborado por: Pamela Valenzuela, Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas

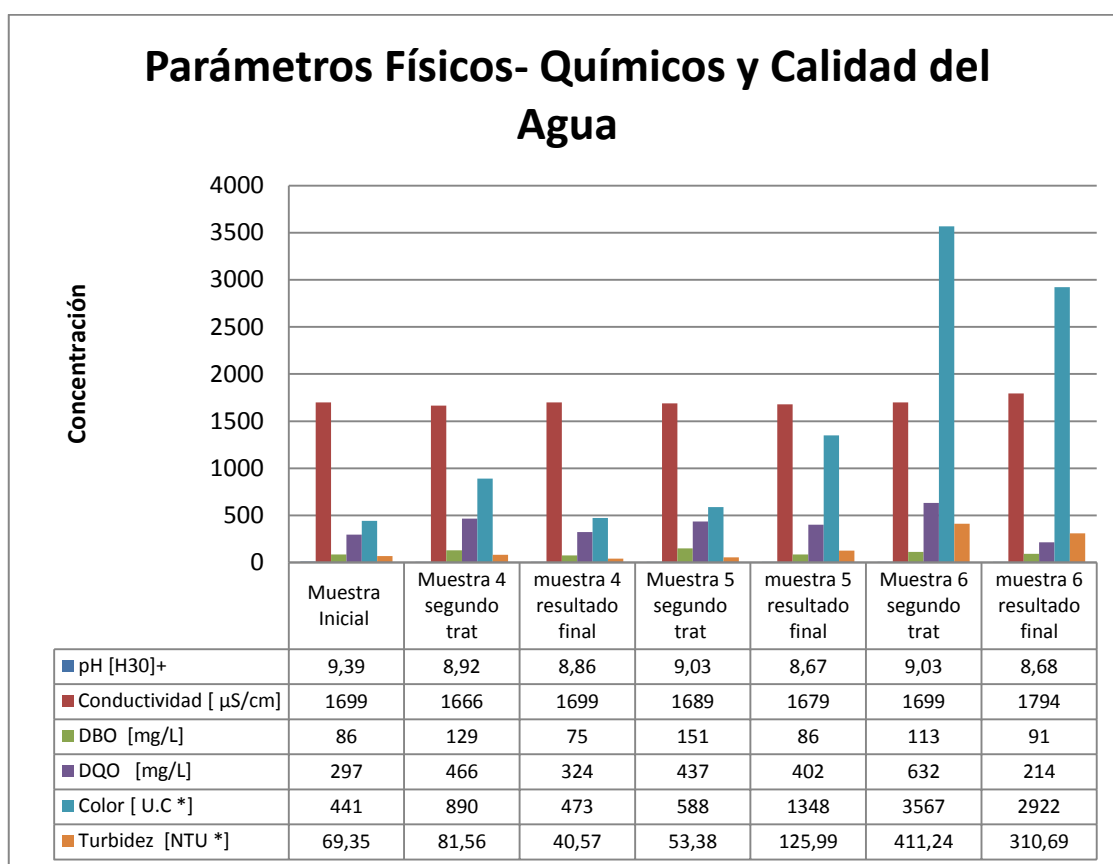


Figura 10. Grafica de los Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas segundo tratamiento: Bioaumentación

Fuente: Autor

El pH de nuestra muestra inicial, debido a el contenido de metales pesados y cianuro se encuentra fuera de los límites del rango máximo permisible para la conservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces, con un 0,39 fuera del rango aceptable esto debido a los diferentes compuestos químicos que se colocan durante el proceso de extracción de oro. En comparación con las tres repeticiones del segundo tratamiento: Bioaumentación, obtuvimos un pH dentro del rango permisible por el TULSMA, obteniendo un resultado final de; (8,86), (8,67), (8,68) respectivamente para cada muestra tratada.

Para la conductividad tenemos un resultado aceptable en todas las muestras ya que la cifra obtenida está dentro de los límites máximos permisibles con referencia para la contaminación de un cuerpo de agua.

La demanda química de oxígeno (DQO) demuestra la cantidad de sustancias disueltas en el agua que pueden ser oxidadas únicamente por medios químicos y que está relacionada con la demanda bioquímica de oxígeno (DBO); esta mide la cantidad de oxígeno consumido que tiende a degradarse u oxidar por medios biológicos. Ambos parámetros son utilizados como referencia para determinar la contaminación de un cuerpo de agua. En la tabla 8 tenemos una relación que nos la proporción de DQO sobre DBO la cual en el resultado final de las tres repeticiones del tratamiento se mantiene dentro del rango permisible de descargas de residuos a cuerpos de agua dulce, siendo mayor la DQO (sobrepasando el límite máximo permisible), indicando que las especies químicas disueltas o en suspensión que se encuentran en las muestras de agua cohiben el crecimiento bacteriano y a su vez la capacidad de oxidar o consumir la materia orgánica presente en las diferentes muestras de agua. La muestra 6, en su resultado dio una concentración de DQO 214mg/l y DBO 91 mg/l que se encuentra dentro del límite máximo permisible.

La concentración de Color Real encontrado en la muestra inicial sobrepasa los niveles máximos permisibles (Inapreciable en dilución 1/20), con un valor de 441 U.C, pero el resultado obtenido en las repeticiones del tratamiento obtuvimos valores más elevados, 473 U.C para la muestra 4, 1348 U.C para la muestra 5 y 2992 U.C para la muestra 6, esta variación se debe a la presencia de sedimentos y demás compuestos químicos que son parte del agua residual de la empresa AIC. La turbidez se encuentra ampliamente relacionada con este parámetro; los resultados obtenidos indican que el agua perteneciente a la muestra inicial no cumple con los límites máximos permisibles (10 NTU), por sobrepasar el límite al tener una concentración de 69,35 NTU. Las muestras 1, 2 y 3 tienen valores que van desde 40,57 NTU., 125,99 NTU., y 310,69 NTU respectivamente.

- **Parámetros físico químicos y de calidad de aguas cálidas dulces superficiales tercer tratamiento: Estimulación**

Tabla 9. *Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas tercer tratamiento. Estimulación*

Parámetros	pH [H3O] ⁺	Conductividad [μ S/cm]	DBO [mg/L]	DQO [mg/L]	Color [U.C.*]	Turbidez [NTU*]
Muestra Inicial	9,39	1699	86	297	441	69,35
Muestra 7 tercer tratamiento	8,9	1789	318	732	1352	125,3
muestra 7 resultado final	8,46	2100	205	803	3378	403,34
Muestra 8 tercer tratamiento	8,31	2050	329	845	1544	149,79
muestra 8 resultado final	8,28	2310	140	830	3515	377,73
Muestra 9 tercer tratamiento	8,44	1938	323	1177	1240	102,23
muestra 9 resultado final	8,26	2080	297	1097	2943	317,19
TULSMA LIBRO VI ANEXO I	5-9	2000	100	250	*	10
					Inapreciable en dilución 1/20	

*U.C: Unidades de Color/ NTU: Unidades Nefelométricas de turbidez.

Nota: Fuente: TULSMA LIBRO VI ANEXO I

Elaborado por: Pamela Valenzuela, Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas

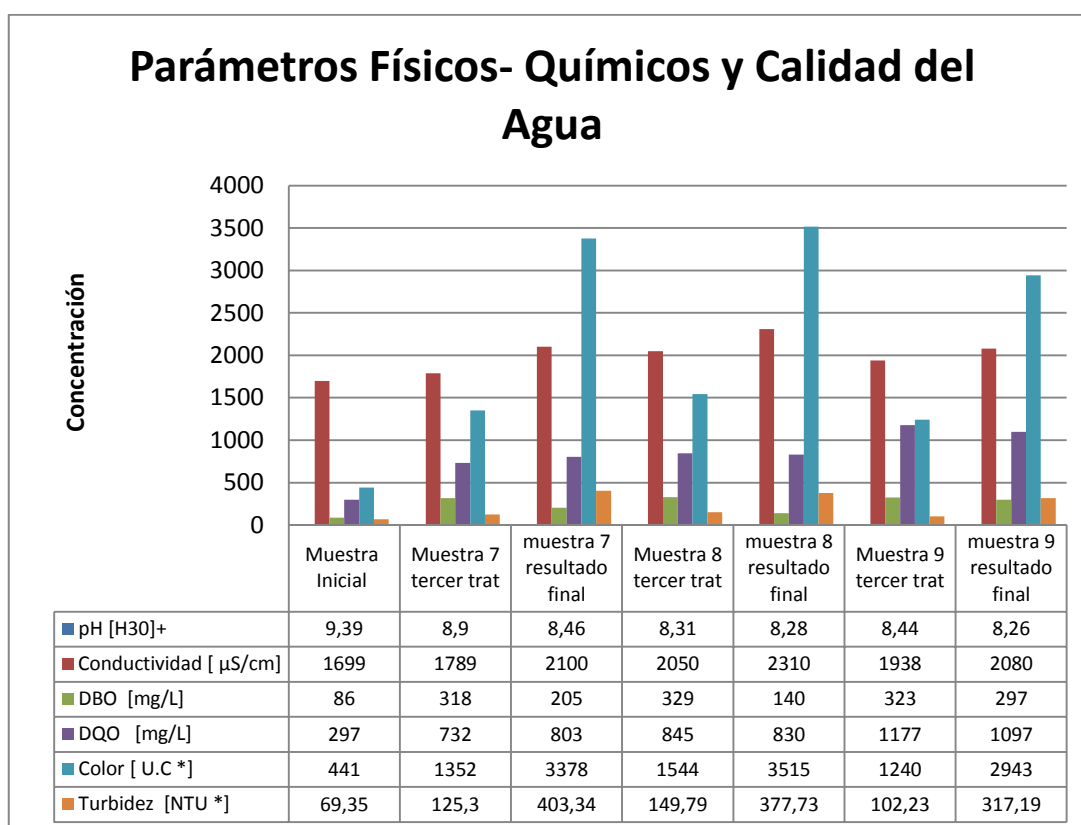


Figura 11. Gráfica de los Parámetros físico-químicos y de calidad de aguas tercer tratamiento. Estimulación

Fuente: Autor

El pH de nuestra muestra inicial, se encuentra fuera del rango permisible para la preservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces, con un 0,39 fuera del rango aceptable esto debido a los diferentes compuestos químicos que se colocan durante el proceso de extracción de oro. En comparación con las tres repeticiones del tercer tratamiento: Estimulación, obtuvimos un pH dentro del rango permisible por el TULSMA, obteniendo un resultado final de; (8,46), (8,28), (8,26) respectivamente para cada muestra tratada.

En la conductividad eléctrica, obtuvimos como resultado una concentración aceptable ya que la cifra obtenida está dentro de los límites máximos permisibles antes durante y después del tratamiento con referencia para la contaminación de un cuerpo de agua.

La demanda química de oxígeno (DQO) demuestra la cantidad de sustancias disueltas en el agua que pueden ser oxidadas únicamente por medios químicos y que está relacionada con

la demanda bioquímica de oxígeno (DBO); esta mide la cantidad de oxígeno consumido que tiende a degradarse u oxidar por medios biológicos. Ambos parámetros son utilizados como referencia para determinar la contaminación de un cuerpo de agua. En la tabla 9 tenemos una relación que refleja la proporción de DQO sobre DBO la cual en el resultado final de las tres repeticiones del tratamiento se mantiene dentro del rango permisible de descargas de residuos a cuerpos de agua dulce, siendo mayor la DQO (sobrepasando el límite máximo permisible), indicando que las especies químicas disueltas o en suspensión que se encuentran en las muestras de agua cohiben el crecimiento bacteriano y a su vez la capacidad de oxidar o consumir la materia orgánica presente en las diferentes muestras de agua.

La concentración de Color Real encontrado en la muestra inicial sobrepasa los niveles máximos permisibles (Inapreciable en dilución 1/20), con un valor de 441 U.C, pero el resultado obtenido en las repeticiones del tratamiento obtuvimos valores más elevados, 3378 U.C para la muestra 7, 3515 U.C para la muestra 8 y 2943 U.C para la muestra 9, esta variación se debe a la presencia de sedimentos y demás compuestos químicos que son parte del agua residual de la empresa AIC. La turbidez se encuentra ampliamente relacionada con este parámetro; los resultados obtenidos indican que el agua perteneciente a la muestra inicial no cumple con los límites máximos permisibles (10 NTU), por sobrepasar el límite al tener una concentración de 69,35 NTU. Las muestras 1, 2 y 3 tienen valores que van desde 403,34 NTU., 377,73 NTU., y 317,19 NTU respectivamente, demostrando un aumento significativo.

4.4. Caracterización molecular

Las bandas obtenidas por DGGE se analizaron usando el software Primer 7 en el cual definimos como representativas aquellas bandas con una intensidad superior o igual al 5% y al 60% esto se identificó mediante una matriz binaria si existe presencia (1) y ausencia (0) de bandas.

Los perfiles de banda fueron comparados mediante una matriz binaria donde se representan los patrones de cada banda. Cada uno de los patrones fue utilizado para la construcción de una matriz de distancia; con la cual, se construye. El MDS (el diagrama de escalamiento

multidimensional) que es un mapa bidimensional con ejes artificiales X y el eje Y donde la “fingerprint” o imagen de DGGE se coloca como un punto de forma que las muestras similares son representadas juntas.

También se realizó un escalamiento espacial de relación Bray-Curtis en base a la matriz binaria de presencia/ausencia de las OTU's encontradas. Se llevó a cabo también un análisis de similitud por medio de la metodología de escalamiento multidimensional (MDS) utilizando una matriz de distancia, la cual, posee la relación Bray-Curtis anteriormente mencionada

Tabla 10. *Secuencias relativas más aproximadas resultado del análisis DGGE*

Banda	Secuencia relativa más cercana	Grupo bacteriano	Gen Bank no. acceso
1	<i>Novosphingobium naphthalenivorans sp.</i>	Proteobacteria	NR_114027.1
2	<i>Marinomonas posidonica sp.</i>	Proteobacteria	NR_074719.1
3	<i>Dickeya aquatica</i>	Proteobacteria	NR_134020.1
4	<i>Thermoanaerobacterium</i>	Firmicutes	CP003066.1
5	<i>Campylobacter subantarcticus</i>	Bacteroidetes	CP012040.1
6	<i>Arcobacter ellisii</i>	Cyanobacteria	CP003552.1
7	<i>Candidatus Blochmannia vafer str. BVAF</i>	Proteobacteria	NR_075061.1
8	<i>Clostridium pasteurianum BCI</i>	Firmicutes	CP003261.1
9	<i>Marivirga tractuosa</i>	Bacteroidetes	CP002349
10	<i>Cyclobacterium amurskyense</i>	Firmicutes	CP000382.1
11	<i>Campylobacter sp. RM16704</i>	Proteobacteria	CP007769.1

Los géneros más representativos obtenidos en el análisis DGGE fueron: Proteobacteria (45.5%), Firmicutes (27,7%), Bacteroidetes (18,4), Cyanobacteria (9.09%).

Se realizó un escalamiento espacial de relación Bray-Curtis en base a la matriz binaria de presencia/ausencia de las OTU's encontradas. Se llevó a cabo también un análisis de similitud por medio de la metodología de escalamiento multidimensional (MDS) utilizando una matriz de distancia, la cual, posee la relación Bray-Curtis.

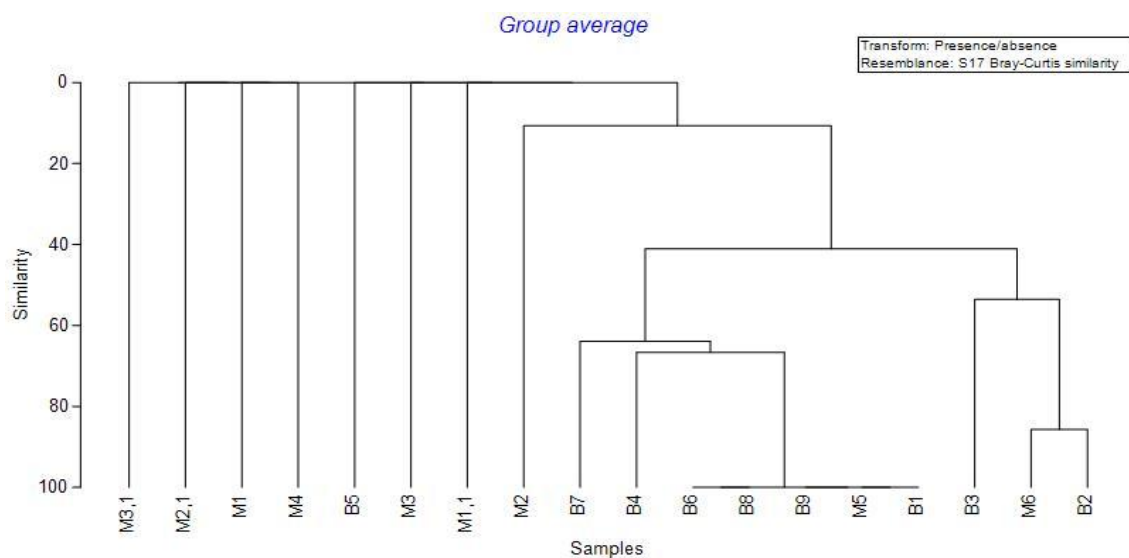


Figura 12. Análisis de similitud (Bray-Curtis) del patrón de bandas obtenidas mediante análisis del gen ARNr 16s por DGGE

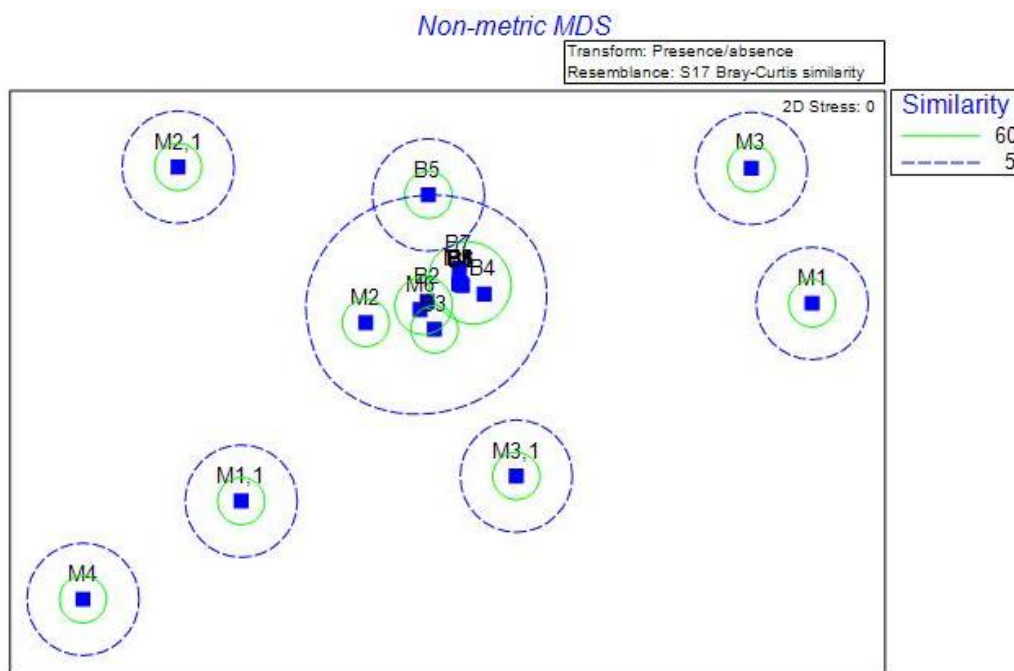


Figura 13. Escalamiento multidimensional del patrón de bandas obtenidas mediante DGGE.

Fuente: Autor

El análisis de similitud y relación Bray-Curtis efectuado entre las comunidades bacterianas estudiadas en los 18 diferentes puntos, indica que existe un 60% de similitud entre la muestra 2 tomada en el río Manduriacu y la muestra 5 y 6 tomadas en la piscina 10 C lugar que recibe las descargas tanto sólidas como líquidas de la planta, además también podemos observar indica que dentro de los botellones de las muestras de agua 1, 2,3,4,6,7,8 y 9 existe 60% de similitud.

El estudio de relación también enseña que existe un 5% de similitud entre todas las muestras tomadas, lo que indica la presencia de una alteración altamente significativa que modifica la similitud drásticamente.

4.5. Socialización de la investigación

La socialización se realizó en el cantón Cotacachi, parroquia García Moreno, comunidad El Corazón, en la sala de conferencias de la Empresa AIC, el día 19 de octubre del 2017 a las 15:00h. Para este evento nos comunicamos con el Ing. Marco Estrella responsable de la empresa en la comunidad y el extendió la invitación a los representantes de las comunidades aledañas al proyecto, también se hizo la invitación a los docentes de la carrera de Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo. Al evento asistieron Cinco Ingenieros representantes de la empresa AIC y dos presidentes de las comunidades EL corazón y Verde Chico respectivamente.

La metodología que se utilizó para la socialización del proyecto de investigación consistió en una presentación en power point y con la ayuda de un proyector se explicó los temas más importantes del estudio, luego de la exposición y de responder inquietudes de los participantes, se procedió a llenar un formulario de firmas de asistencia y también se aplicó una encuesta, con la finalidad de evaluar el aspecto en base la organización del evento y contenido que presenta la investigación.

En base a la Organización del evento de socialización los participantes indicaron lo siguiente:

En la figura 14, con respecto a la comodidad que brindó la sala donde se desarrolló el evento, se obtuvo un 85,71% de aceptación muy alto y un 14,28% alto. En cuestión del adecuado uso del material audiovisual, el 100% de los participantes lo estiman como muy alto, indicando un resultado positivo en la organización del evento.

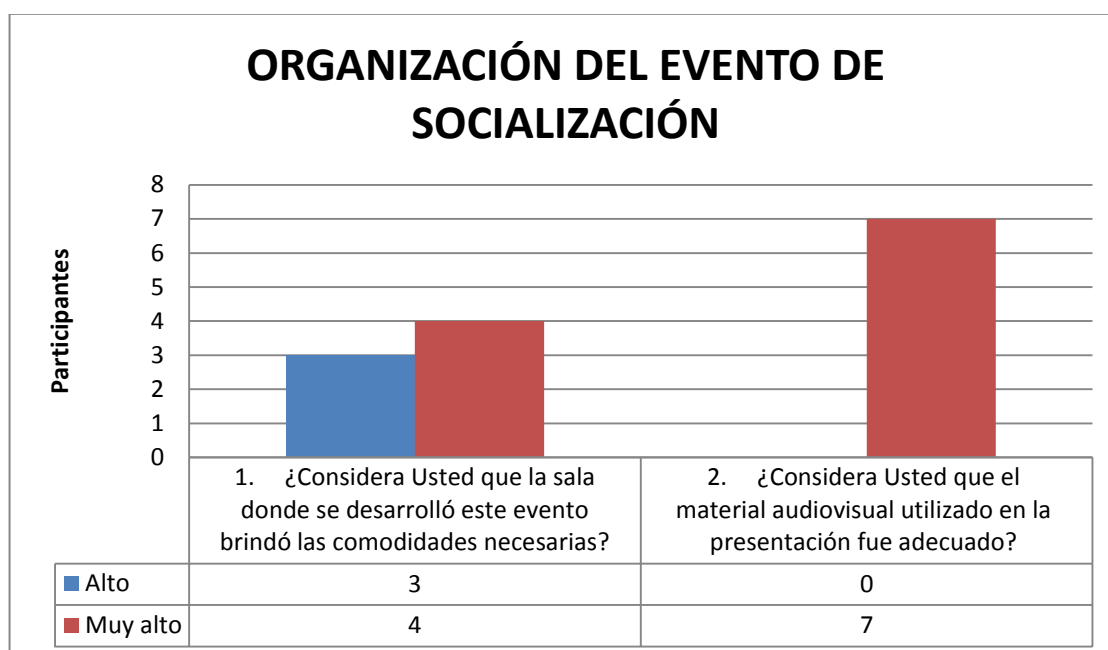


Figura 14. *Gráfica de la Tabulación del aspecto organizacional del evento de socialización.*

Fuente. Autor

En la Figura 15, se indica que en el caso del dominio del tema por parte del expositor, el 100% lo determina como muy alto, para el manejo adecuado del auditorio por parte del expositor, el 85,71% lo estima como muy alto; mientras que el 14,28% como alto, y por último la facilidad de expresión del expositor obtuvo un 100% muy alto.

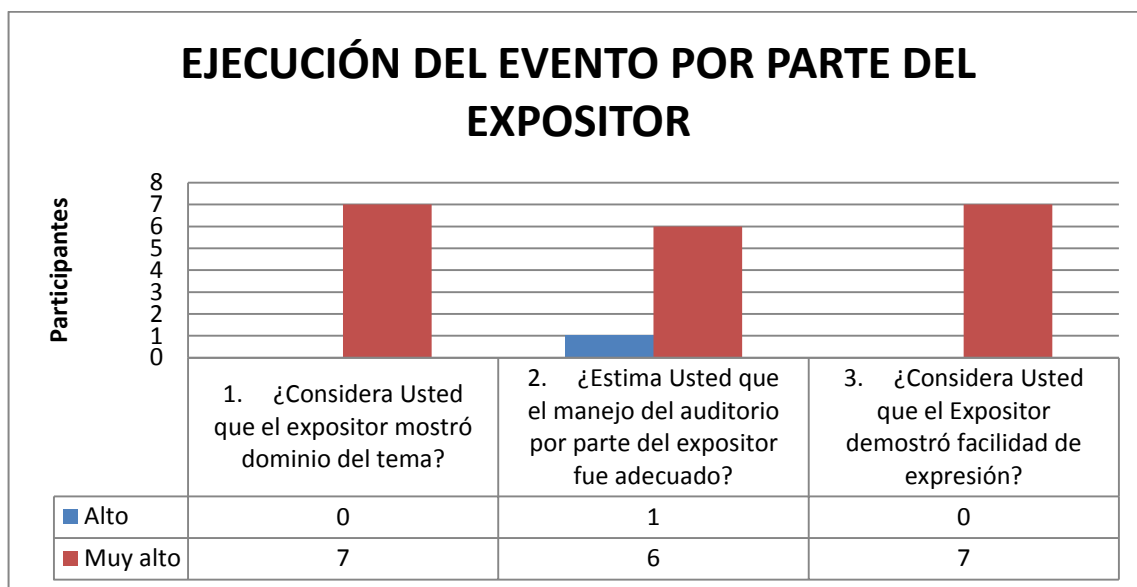


Figura 15. Gráfica de la tabulación del aspecto ejecución del evento por parte del expositor.

Fuente. Autor

La Figura 16 señala que con relación a la relevancia del tema de investigación hacia algún actor o sector de la sociedad obtuvo un 85,71% muy alto y un 14,28% en alto, en el caso de que la investigación posea percepciones para estudios complementarios posteriores se indica en un 100% muy alto. Se estima un 85,71% muy alto en que la investigación genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización social, empresa pública o privada, comunidad o institución y un 14,28% en alto, por último con el aspecto del cumplimiento de los objetivos planteados, el 14,28% señala un estándar alto, mientras que un 85,71% muy alto.

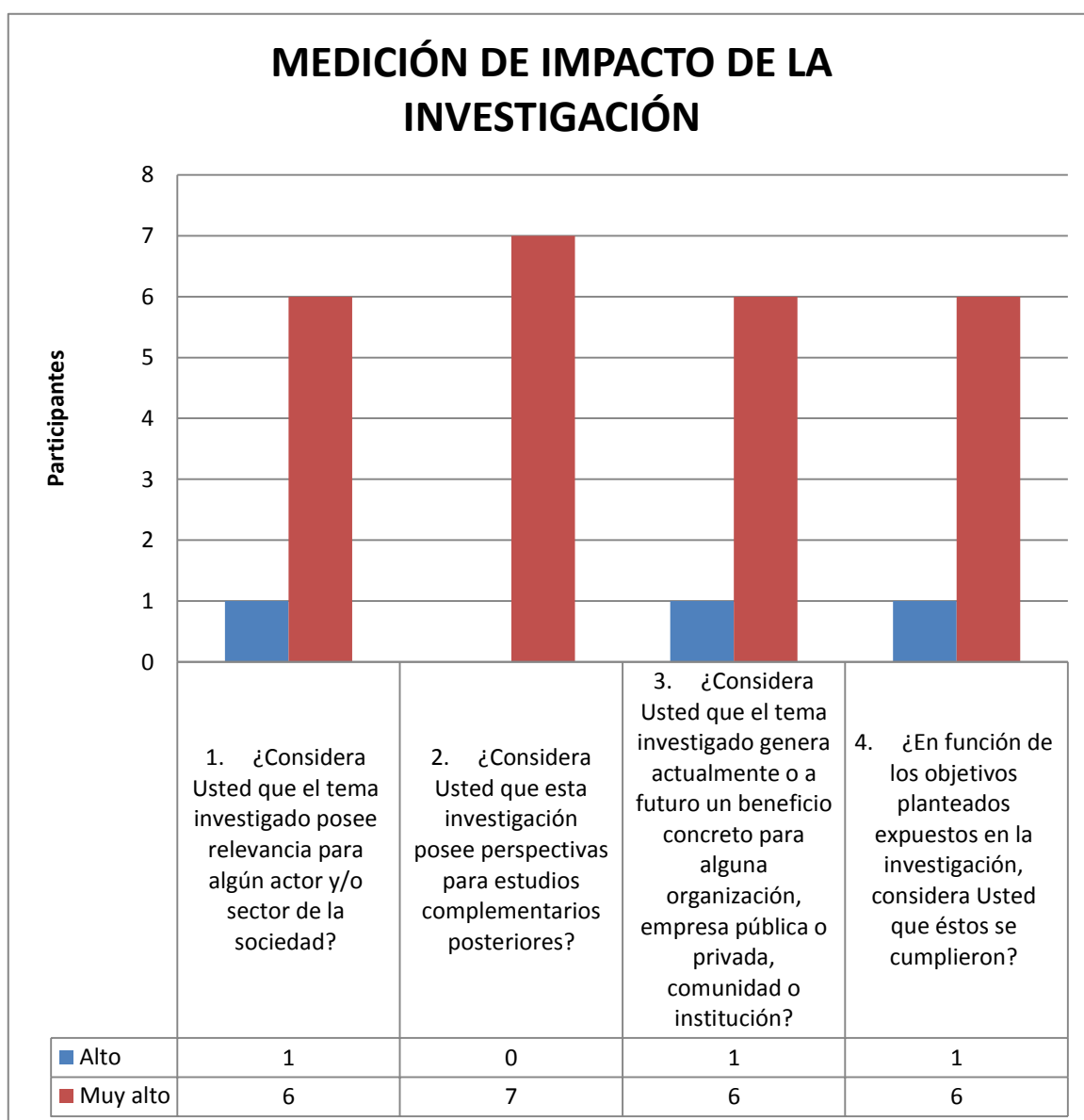


Figura 16. Gráfica de la tabulación del aspecto medición de impacto de la investigación.

Fuente. Autor

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Diferentes tratamientos normalmente utilizados para la reducción de cianuro, son eficientes pero su costo es elevado, al finalizar la investigación se pudo concluir que la utilización de tratamientos microbianos también es efectiva y puede reducir grandes cantidades de Cianuro, además que esta resulta ser económica.

Terminada la investigación y después del análisis parcial de los resultados se concluyó que los tres tratamientos aplicados fueron efectivos pero el que mayor nivel de remediación tuvo fue el segundo tratamiento: Bioaugmentación, indicando que al saturar un espacio con bacterias propias de una zona estas pueden actuar como degradadoras y remediar aguas contaminadas.

Los parámetros físico químicos del análisis de calidad de agua, corresponden a un ecosistema lentic, con turbidez que sobrepasa el límite máximo permisible propuesto por el TULSMA, LIBRO VI –ANEXO 1, además El agua posee un pH ligeramente alcalino que se mantuvo desde el inicio hasta el final de la investigación.

El análisis de DQO indicó que existe contaminación química de (297 mg/l) en la muestra inicial y persistió por encima del límite máximo permisible en todas las muestras de los diferentes tratamientos la muestra de mayor impacto es la N°9 con (1097 mg/l), mientras que, el análisis DBO₅ reveló que en el tercer tratamiento las muestras 7 con (205 mg/l), muestra 8 (140 mg/l) y muestra 9 (297mg/l) poseen contaminación bioquímica por encima del límite máximo permisible establecido por el TULSMA, LIBRO VI –ANEXO 1.

Los análisis de metales pesados mostraron que el Mercurio (Hg) sufre una alteración en su concentración esta disminuye proporcionalmente durante la investigación teniendo como resultado en los dos primeros tratamientos con valores de: (0,0038mg/l) muestra 1, (0,005mg/l) muestra 3, (0,0021) muestra 4, disminución cumpliendo el límite máximo

permisible por el TULSMA, LIBRO VI ANEXO 1 que indica que el (0,005mg/l). Cosa que no pasa con el Cromo y Plomo, ya que estos elementos mantienen su concentración y no disminuye, encontrándose por encima del límite máximo permisible establecido en el TULSMA, LIBRO VI –ANEXO 1.

El escalamiento multidimensional del patrón de bandas (MDS) indicó que existe un 60% de similitud entre la muestra 2 tomada en el río Manduriacu, la muestra 5 y 6 tomadas en la piscina 10 C y entre los botellones de agua B1, B2, B3, B4, B6, B7, B8 y el B9, mientras que el estudio de relación también enseña que existe un 5% de similitud entre todas las muestra tomadas, lo que indica la presencia de una alteración altamente significativa que modifica la similitud drásticamente.

5.2.Recomendaciones

Investigar más a fondo sobre las especies bacterianas identificadas en la investigación con el fin de identificar su potencial de remediación para el ambiente y poder aplicar esto a la industria minera.

Investigar alimentos alternativos que puedan servir de manera natural a la estimulación de las cepas bacterianas, con el fin de aplicar esto de manera efectiva en la industria minera.

Bibliografía

- Agudelo, J., Betancur, J., Martínez, W., Castañeda, C., Castaño, M., & Largo, R. (2016). Biolixiviación de minerales sulfurados. *Revista Facultad de Ingeniería*, (27), 110-122
- Alegría Coto, J. R. (2013). *Biotechnología y biorremediación*.
- Almaguer Rodríguez, J. D. L. (2014). Estudio geoquímico de elementos traza en unidades volcánicas del CVSLP: método ICP-MS (validación del método).
- Areco, M. D. M. (2011). *Métodos alternativos para el tratamiento de la contaminación ambiental por metales pesados (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires)*.
- Astete, J., Cáceres, W., Gastañaga, M. D. C., Lucero, M., Sabastizagal, I., Oblitas, T., ... & Rodríguez, F. (2009). Intoxicación por plomo y otros problemas de salud en niños de poblaciones aledañas a relaves mineros. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(1), 15-19.
- Azario, R. R. (2014). *Análisis de toxicidad de metales contaminantes sobre el crecimiento de Escherichia coli: efecto de cromo, plomo y cadmio en solución (Doctoral dissertation)*.
- Aznárez, P., Palacios, F., & Vidal, J. (1982). Determinación de plomo por espectrofotometría de absorción atómica con atomización electrotérmica después de la extracción con 1-pirrolidin-ditiocarbamato amónico: aplicación al análisis de agua natural y materia vegetal. Obtenido de Repositorio institucional del Consejo Superior de Investigaciones Científicas: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/45492/1/An.%20Estac.%20Exp.%20Aula%20D ei%2016%20%281-2%29%2045-54%20Aznarez%20%281982%29.pdf>
- Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197.
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA-MEXICO-*, 42(3), 131-143.

- Cabrera Taco Luis . (2015). *Técnicas biológicas para la degradación de contaminantes* (Bachelor's thesis, PUCE).
- Cáceres Arenas, G. (2001). Impacto Ambiental de la minería del Oro. *Revista Metalúrgica UTO*, 19.
- Cornejo La Torre, M. D. (2016). Universidad Nacional De Tumbes. Obtenido De Biorremediación De Relaves Mineros Con Un Consorcio Microbiano Nativo Caracterizado Molecularmente Y Productor De Enzimas Degradadoras De Cianuro Y Derivados.
- Cuberos, E., Rodriguez, A. I., & Prieto-Suárez, E. (2009). Niveles de cromo y alteraciones de salud en una población expuesta a las actividades de curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11(2), 278-289.
- Empresa Agroindustrial “El corazón”. (2011), Historia de fundación, información interna.
- Falconi Miño, Freddy. (2012). Diseño De Un Sistema De Gestión Integral De Aguas Residuales Industriales Generadas Por El Proceso De Explotación Minera En El Proyecto Corazón, Cantón Cotacachi. (Tesis para la obtención del título de Ingeniero Ambiental Grado Académico de Tercer Nivel, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/665/1/T-UCE-0012-90.pdf>
- García, M. (2010). Captura de CO₂ mediante algas unicelulares. Recuperado de: <http://www.ceigram.upm.es/sfs/otros/ceigram/Beca%20Ceigram%202010M%C2%A A%20Jos%C3%A9%20Garc%C3%ADa%20Vicente.pdf>
- Infantas, M. M. V. (2005). Intoxicación por plomo. *Rev Soc Per Med Inter*, 18, 22-27.
- Leyva, R., Flores, J. V., Díaz, P. E., & Berber, M. S. (2008). Adsorción de cromo (VI) en solución acuosa sobre fibra de carbón activado. *Información tecnológica*, 19(5), 27-36.
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(1).
- Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., & García, F. P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29-44.

- Montenegro, Raúl A. (2003). Estudio Sobre El Impacto Ambiental Y Sanitario De Las Minas De Oro. El Caso Cordón Esquel. (Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Córdoba). Recuperado de <http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2006/4/estudio-sobre-el-impacto-ambie.pdf>
- Mora Collazos, A. (2016). Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas industriales contaminadas con cromo hexavalente. *Nova Scientia*, 8(17).
- Nava Alonso, F., Elorza Rodríguez, E., Pérez Garibay, R., & Uribe Salas, A. (2007). Análisis químico de cianuro en el proceso de cianuración: revisión de los principales métodos. *Revista de metalurgia*, 43(1), 20-28. Recuperado de <http://revistademetalurgia.revistas.csic.es/index.php/revistademetalurgia/article/view/48/48>
- Orozco, V., & Mercedes, M. (2008). Biorremediación De Vegetación Contaminada Con Petróleo Por Derrames En El Campamento Guarumo –Petroproducción. Obtenido De Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Repositorio Virtual: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/225/1/236T0009.pdf>
- Pérez, Ó. D. B., Giraldo, L. I. B., Agudelo, É. A., & Gallo, S. A. C. (2013). Tecnologías de tratamiento para la Tierra Fuller contaminada con aceite dieléctrico. *Revista EIA*, 10(19), 33-48.
- Pesántez Aucay, José Luis. (2015). Caracterización geológica y geotécnica en el área minera " El Corazón", para el diseño de una relavera. (Tesis para la obtención del título de Ingeniero Ambiental Grado Académico de Tercer Nivel, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3746/1/53T0003%20PESANTEZ%20JOSE.pdf>
- Pesántez Vallejo, J. P. (2014). Estudio del proceso de depuración de aguas residuales industriales provenientes de empresas mineras.
- Pirrone, N., Costa, P., Pacyna, J.M. & Ferrara, R. (2001): Atmospheric Mercury Emissions from Anthropogenic and Natural Sources in the Mediterranean Region. *Atmospheric Environment* 35, 2997-3006.

- PNUMA. (Enero de 2012). El uso del mercurio en la minería del oro artesanal y en pequeña escala. Obtenido de Time to Act -Get Involved: http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Mercury/AwarenessPack/Spanish/UNEP_Mod3_Spanish_Web.pdf
- Quintana, P. (2002). Impulsan un megaproyecto minero en Esquel sin garantías medioambientales ni financieras de ningún tipo. Informe elaborado para el Equipo Nizkor, Esquel, 7 de noviembre de 2002, 6 p. Recuperado de <http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2006/4/estudio-sobre-el-impacto-ambie.pdf>
- Restrepo, O. J., Montoya, C. A., & Muñoz, N. A. (2006). Degradación microbiana de cianuro procedente de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P. fluorescens*. *Dyna*, 73(149).
- Rodríguez, N. J. P., Carvajal, S., Gallo, A., & Peñuela, G. (2013). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Producción+ Limpia*, 7(1).
- Silver, S., & Phung, L. (27 de Octubre de 2010). BACTERIAL HEAVY METAL RESISTANCE: New Surprises. Obtenido de Microbiology Annual Reviews: www.annualreviews.org
- Soto, C., Gutiérrez, S., Rey-León, A., & González-Rojas, E. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en los riberanos de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *NOVA*, 8(14).
- Suárez, P., & Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27(4).
- Téllez, J., Roxs, M. C., & Gaitán, A. M. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(1), 50.
- Vargas Pérez, J. D., Contreras, L., & Alexandra, S. (2011). Caracterización de bacterias metalofijadoras de mercurio, a través de la subunidad 16srna, mediante la técnica de pcr-dgge del río gala (aguas abajo del recinto San Rafael) en la parroquia tenguel (Bachelor's thesis).

Vullo, D. (12 de Noviembre de 2003). Microorganismos Y Metales Pesados: Una Interacción En Beneficio Del Medio Ambiente. Obtenidode RevistaQuímicaViva Vol. 2, número 3.

ANEXOS



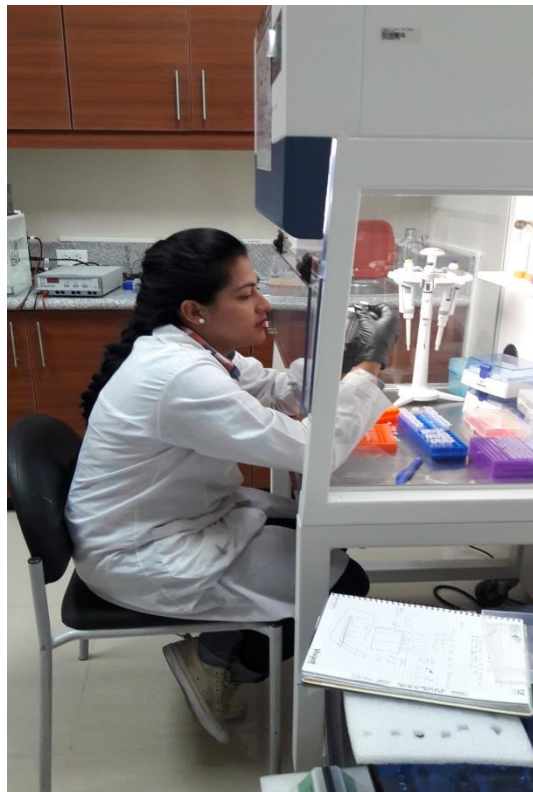
Anexo 1. *Toma de muestras para la obtención de cepas bacterianas*



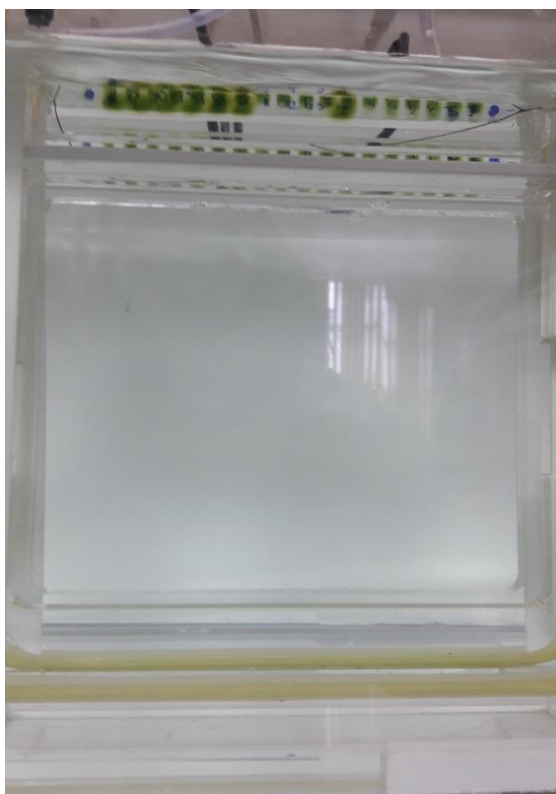
Anexo 2. *Aislamiento de Cepas Bacterianas*



Anexo 3. *Área de ubicación del ensayo*



Anexo 4. *Amplificación de ADN*



Anexo 5. *Técnica de DGGE*



Anexo 6. *Frascos utilizados para el envío de muestras al laboratorio GRUENTEC Cia Ltda.*

Anexo 7. Resultado de análisis muestra inicial (Inicio)



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua

Muestra Recibida: 27-may-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 07-jun-17

Número reporte Gruentec: 1705537-AG001

Rotulación Muestra:	MUESTRA UNICA	Método Adaptado de Referencia / Método interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1705537-AG001	
Aniones y No Metales:		
Cianuro Total mg/l ^(1,2)	173 ⁽ⁿ⁾	SM 4500 CN / MM-AG-28
Metales totales:		
Aluminio mg/l ^(1,2)	2.3 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Antimonio mg/l ^(1,2)	0.52 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Arsénico mg/l ^(1,2)	0.46 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Azufre mg/l ^(1,2)	88 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Bario mg/l ^(1,2)	0.025 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Berilio mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Boro mg/l ^(1,2)	0.1 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cadmio mg/l ^(1,2)	0.012 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Calcio mg/l ^(1,2)	5.1 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cerio mg/l *	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cesio mg/l ^(1,2)	0.0026 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobalto mg/l ^(1,2)	1.3 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobre mg/l ^(1,2)	74* ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cromo mg/l ^(1,2)	0.0068 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Disprosió mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Erbio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estaño mg/l ^(1,2)	0.0014 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estroncio mg/l ^(1,2)	0.047 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Europio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Fósforo mg/l ^(1,2)	<0.1 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Gadolinio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Galio mg/l ^(1,2)	0.0016 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Germanio mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hafnio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hierro mg/l ^(1,2)	11 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Holmio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lantano mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Litio mg/l ^(1,2)	<0.001 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lutecio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Magnesio mg/l ^(1,2)	0.35 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Manganeso mg/l ^(1,2)	0.023 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Mercurio mg/l ^(1,2)	0.048 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Molibdeno mg/l ^(1,2)	0.37 ^{(1) (o)}	EPA 6020 B / MM-AG/S-39


Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 2



Acreditación N° OAE LE 2C 05-008
LABORATORIO DE ENSAYOS

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua

Muestra Recibida: 27-may-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 07-jun-17

Número reporte Gruentec: 1705537-AG001

Rotulación Muestra:	MUESTRA UNICA	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	n.d	
No. Reporte Gruentec:	1705537-AG001	
Metales totales:		
Neodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Niobio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Níquel mg/l ^(1,2)	0.55 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plata mg/l ^(1,2)	0.92 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plomo mg/l ^(1,2)	0.0012 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Potasio mg/l ^(1,2)	8.2 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Praseodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Rubidio mg/l *	0.012 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Samario mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Selenio mg/l ^(1,2)	0.25 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Silicio mg/l ^(1,2)	4.8 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Sodio mg/l ^(1,2)	290* ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Talio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tantalio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Teluro mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Titanio mg/l ^(1,2)	0.015 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Torio mg/l ^(1,2)	0.0012 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tulio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Uranio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Vanadio mg/l ^(1,2)	0.031 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Wolframio mg/l *	0.016 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Yterbio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Zinc mg/l ^(1,2)	1.9 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Zirconio mg/l ^(1,2)	0.0014 ^(1) o)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

n.d - No Determinado

1) Debido a la naturaleza de la muestra se realiza dilución 2X.

n) Debido a la naturaleza de la muestra se realiza dilución 2500X

o) Método de Digestión : EPA 3005a

INCERTIDUMBRE (U):

Metales en Agua = 30%; Conductividad en agua = 11%; Cianuro Total = 22%

Cálculo: C +/- (UxC/100) en donde: C=valor medido; U= incertidumbre %.



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 2 de 2

Anexo 8. Resultado del primer envío de 9 muestras enviadas al Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua - Tesis

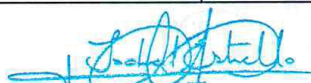
Muestra Recibida: 12-jun-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 16-jun-17

Número reporte Gruentec: 1706198-AG001

Rotulación Muestra:	Muestra # 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	02-jun-17	
No. Reporte Gruentec:	1706198-AG001	
Físico Químico:		
Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$ ^(1,2)	1615	EPA 9050 A / MM-AG/S-02
Aniones y No Metales:		
Cianuro Total mg/l ^(1,2)	142	SM 4500 CN / MM-AG-28
Metales totales:		
Aluminio mg/l ^(1,2)	1.2 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Antimonio mg/l ^(1,2)	0.45 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Arsénico mg/l ^(1,2)	0.4 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Azufre mg/l ^(1,2)	65 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Bario mg/l ^(1,2)	0.019 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Berilio mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Boro mg/l ^(1,2)	0.14 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cadmio mg/l ^(1,2)	0.0098 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Calcio mg/l ^(1,2)	4.4 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cerio mg/l *	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cesio mg/l ^(1,2)	0.0026 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobalto mg/l ^(1,2)	0.62 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobre mg/l ^(1,2)	61 * ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cromo mg/l ^(1,2)	0.0042 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Disprosio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Erbio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estaño mg/l ^(1,2)	0.021 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estroncio mg/l ^(1,2)	0.039 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Europio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Fósforo mg/l ^(1,2)	<0.1 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Gadolinio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Galio mg/l ^(1,2)	0.0011 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Germanio mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hafnio mg/l ^(1,2)	0.0011 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hierro mg/l ^(1,2)	7.7 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39


Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua - Tesis

Muestra Recibida: 12-jun-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 16-jun-17

Número reporte Gruentec: 1706198-AG001

Rotulación Muestra:	Muestra # 1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	02-jun-17	
No. Reporte Gruentec:	1706198-AG001	
Metales totales:		
Holmio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lantano mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Litio mg/l ^(1,2)	<0.001 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lutecio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Magnesio mg/l ^(1,2)	0.2 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Manganeso mg/l ^(1,2)	0.013 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Mercurio mg/l ^(1,2)	0.011 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Molibdeno mg/l ^(1,2)	0.31 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Neodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Niobio mg/l ^(1,2)	0.0036 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Níquel mg/l ^(1,2)	0.43 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plata mg/l ^(1,2)	1.4 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plomo mg/l ^(1,2)	0.0038 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Potasio mg/l ^(1,2)	6.9 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Praseodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Rubidio mg/l *	0.011 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Samario mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Selenio mg/l ^(1,2)	0.2 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Silicio mg/l ^(1,2)	3.4 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Sodio mg/l ^(1,2)	250* ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Talio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tantalio mg/l ^(1,2)	0.002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Teluro mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Titanio mg/l ^(1,2)	0.0044 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Torio mg/l ^(1,2)	0.0046 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tulio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Uranio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Vanadio mg/l ^(1,2)	0.026 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Wolframio mg/l *	0.015 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39



Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Anexo 9. Resultado del segundo envío de 9 muestras enviadas al Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua - Tesis

Muestra Recibida: 12-jun-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 16-jun-17

Número reporte Gruentec: 1706200-AG001

Rotulación Muestra:	Muestra # 1.1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	09-jun-17	
No. Reporte Gruentec:	1706200-AG001	

Físico Químico:		
Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}^{(1,2)}$	1632	EPA 9050 A / MM-AG/S-02

Aniones y No Metales:		
Cianuro Total $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	142	SM 4500 CN / MM-AG-28

Metales totales:		
Aluminio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	1.2 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Antimonio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.54 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Arsénico $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.47 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Azufre $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	81 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Bario $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.02 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Berilio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Boro $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.14 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cadmio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.0085 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Calcio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	5.2 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cerio mg/l^*	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cesio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.0026 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobalto $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.49 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobre $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	69* ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cromo $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.0067 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Disprosio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Erbio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estaño $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.069 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estroncio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.048 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Europio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Fósforo $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.1 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Gadolinio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Galio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	0.0012 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Germanio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hafnio $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hierro $\text{mg}/\text{l}^{(1,2)}$	7.4 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39

Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 27

San Juan de Cumbayá- Eloy Alfaro S7-157 y Belisario Quevedo. P.O. Box 17-22-20064 Quito- Ecuador
Telfs: 601-4371 / 603-9221/600-5273 - E-mail: info@gruentec.com - www.gruentec.com

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua - Tesis

Muestra Recibida: 12-jun-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 16-jun-17

Número reporte Gruentec: 1706200-AG001

Rotulación Muestra:	Muestra # 1.1	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	09-jun-17	
No. Reporte Gruentec:	1706200-AG001	

Metales totales:		
Holmio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lantano mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Litio mg/l ^(1,2)	<0.001 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lutecio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Magnesio mg/l ^(1,2)	0.24 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Manganeso mg/l ^(1,2)	0.016 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Mercurio mg/l ^(1,2)	0.012 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Molibdeno mg/l ^(1,2)	0.38 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Neodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Niobio mg/l ^(1,2)	0.0009 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Niquel mg/l ^(1,2)	0.47 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plata mg/l ^(1,2)	2.3 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plomo mg/l ^(1,2)	0.0038 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Potasio mg/l ^(1,2)	8.1 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Praseodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Rubidio mg/l *	0.012 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Samario mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Selenio mg/l ^(1,2)	0.24 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Silicio mg/l ^(1,2)	3.9 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Sodio mg/l ^(1,2)	299* ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Talio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tantalio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Teluro mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Titanio mg/l ^(1,2)	0.0029 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Torio mg/l ^(1,2)	0.0012 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tulio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Uranio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Vanadio mg/l ^(1,2)	0.03 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Wolframio mg/l *	0.018 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39



Ing. Isabel Estrella
Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Anexo 10. Resultado del segundo envío de 9 muestras enviadas al Laboratorio GRUENTEC Cía. Ltda.



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua - Tesis

Muestra Recibida: 16-jun-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 28-jun-17

Número reporte Gruentec: 1706313-AG001

Rotulación Muestra:	Muestra # 1.2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	16-jun-17	
No. Reporte Gruentec:	1706313-AG001	

Físico Químico:		
Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$ ^(1,2)	1643	EPA 9050 A / MM-AG/S-02

Aniones y No Metales:		
Cianuro Total mg/l ^(1,2)	81	SM 4500 CN / MM-AG-28

Metales totales:		
Aluminio mg/l ^(1,2)	1.6 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Antimonio mg/l ^(1,2)	0.53 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Arsénico mg/l ^(1,2)	0.502 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Azufre mg/l ^(1,2)	91 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Bario mg/l ^(1,2)	0.019 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Berilio mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Boro mg/l ^(1,2)	0.09 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cadmio mg/l ^(1,2)	0.0073 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Calcio mg/l ^(1,2)	5.4 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cerio mg/l *	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cesio mg/l ^(1,2)	0.0022 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobalto mg/l ^(1,2)	1.5 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cobre mg/l ^(1,2)	86* ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Cromo mg/l ^(1,2)	0.0071 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Disprosiio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Erbio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estaño mg/l ^(1,2)	0.091 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Estroncio mg/l ^(1,2)	0.044 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Europio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Fósforo mg/l ^(1,2)	<0.1 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Gadolinio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Galio mg/l ^(1,2)	0.0016 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Germanio mg/l ^(1,2)	<0.0004 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hafnio mg/l ^(1,2)	0.0006 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Hierro mg/l ^(1,2)	11 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39


Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 1 de 3

San Juan de Cumbayá - Eloy Alfaro S7-157 y Belisario Quevedo. P.O. Box 17-22-20064 Quito - Ecuador
Telfs: 601- 4371 / 603 - 9221/ 600 - 5273 - E-mail: info@gruentec.com - www.gruentec.com

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: Compañía Agroindustrial El Corazón S.A.
Boyaca N1968 y Av. Universitaria
Telf: 2542641

Atn: Arq. Jorge Escobar

Proyecto: Análisis de Agua - Tesis

Muestra Recibida: 16-jun-17

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 28-jun-17

Número reporte Gruentec: 1706313-AG001

Rotulación Muestra:	Muestra # 1.2	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	16-jun-17	
No. Reporte Gruentec:	1706313-AG001	
Metales totales:		
Holmio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lantano mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Litio mg/l ^(1,2)	<0.001 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Lutecio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Magnesio mg/l ^(1,2)	0.3 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Manganeso mg/l ^(1,2)	0.016 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Mercurio mg/l ^(1,2)	0.0038 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Molibdeno mg/l ^(1,2)	0.37 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Neodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Niobio mg/l ^(1,2)	0.0003 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Níquel mg/l ^(1,2)	0.61 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plata mg/l ^(1,2)	2.3 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Plomo mg/l ^(1,2)	0.0014 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Potasio mg/l ^(1,2)	9.2 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Praseodimio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Rubidio mg/l *	0.012 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Samarium mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Selenio mg/l ^(1,2)	0.26 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Silicio mg/l ^(1,2)	6.1 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Sodio mg/l ^(1,2)	342* ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Talio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tantalio mg/l ^(1,2)	0.0005 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Teluro mg/l ^(1,2)	0.0005 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Titanio mg/l ^(1,2)	0.018 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Torio mg/l ^(1,2)	0.001 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Tulio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Uranio mg/l ^(1,2)	<0.0002 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Vanadio mg/l ^(1,2)	0.037 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39
Wolframio mg/l *	0.021 ^(1) n)	EPA 6020 B / MM-AG/S-39



Ing. Isabel Estrella
Gerente de Operaciones


Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 2 de 3

Anexo 11. Encuesta del proceso de socialización de investigación



**Pontificia Universidad
Católica del Ecuador**

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA	19/10/2017		
EXPOSITOR	Jessica Pamela Valenzuela Torres		
LUGAR	DENTRO PUCESI	FUERA PUCESI	X

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:					
1. ¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?				X	
2. ¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					X
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					X
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?				X	
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					X
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?				X	
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					X
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?				X	
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					X
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
<i>Todo las empresas q vitidegan conntro, se debe implementar tarifa, bajar los niveles de consumo.</i>					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRIAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					
<i>Para q funcione se debe tener dispersion en colegios y universidades y empresas privadas. Para remediar ambientes contaminados.</i>					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					AGROINDUSTRIAL.



Anexo 12. *Socialización de la investigación a integrantes de AIC.*



Anexo 13. *Exposición de los resultados a los participantes de la empresa AIC*

